

Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von  
spezifizierenden Proteinen des Glucosinolatstoffwechsels der  
Brassicaceae

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Alina Friederike Dörr  
aus Freiburg im Breisgau

1. Referentin:  
2. Referent:  
eingereicht am:  
mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professorin Dr. Ute Wittstock  
apl. Professor Dr. Robert Hänsch  
20.02.2017  
24.05.2017

Druckjahr 2017

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Wittstock, U., Meier, K., Dörr, F., Ravindran, B.M. NSP-dependent simple nitrile formation dominates upon breakdown of major aliphatic glucosinolates in roots, seeds, and seedlings of *Arabidopsis thaliana* Columbia-0. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-15 (2016)

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Ute Wittstock für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren und für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Bei Prof. Dr. Robert Hänsch (Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig) bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens, für die nette Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Unterstützung bei dem Kooperationsprojekt.

Bei Prof. Dr. Ludger Beerhues möchte ich mich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission bedanken.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der AG Wittstock und des Instituts für Pharmazeutische Biologie für die gemeinsame schöne Zeit. Beena Ravindran und Kathrin Meier möchte ich für die Anzucht und genetische Charakterisierung der T-DNA-Mutanten danken. Außerdem danke ich Kathrin Meier für die Durchführung der qPCR-Analysen. Marion Wiggermann möchte ich an dieser Stelle besonders danken für die zahlreichen schönen Gespräche und wunderbaren Musicalbesuche, die hoffentlich auch in Zukunft weiter stattfinden werden.

Der AG Hänsch danke ich für die nette und herzliche Aufnahme in ihrem Arbeitskreis. Ein großer Dank geht an die zahlreichen Praktikanten und Bachelorstudenten, die mich bei Infiltrationen, Versuchen oder Versuchsvorbereitungen unterstützt, einige Expressionskonstrukte für mich hergestellt und immer für gute Stimmung im Labor gesorgt haben. Bei Dr. David Kaufholdt möchte ich mich für die vielen Diskussionen, Problemlösungsfindungen und Hilfsbereitschaft herzlichst bedanken sowie für die Unterstützung bei dem Kooperationsprojekt.

Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meinen Eltern und bei meinem Freund Felix für die Unterstützung und den Zuspruch bedanken.



## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1.	Das Glucosinolat-Myrosinase-System .....	1
1.2.	Komponenten des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in <i>A. thaliana</i> .....	4
1.3.	Kompartimentierung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems .....	7
1.3.1.	Vorkommen der Myrosinase.....	7
1.3.2.	Vorkommen der Glucosinolate .....	9
1.3.3.	Vorkommen der spezifizierenden Proteine .....	9
1.4.	Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierenden Proteinen .....	10
1.5.	Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen <i>in planta</i> .....	11
1.6.	Zielsetzung .....	13
2.	Material .....	14
2.1.	Chemikalien, Reagenzien und Geräte .....	14
2.2.	Plasmide .....	14
2.3.	Bakterienstämme .....	17
2.4.	Pflanzen .....	18
2.4.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
2.4.2.	<i>Nicotiana benthamiana</i> .....	19
3.	Methoden .....	20
3.1.	Statistik .....	20
3.2.	Bestimmung des Glucosinolatgehalts .....	20
3.2.1.	Gewinnung der Desulfoglucosinolate .....	20
3.2.2.	Analyse der Desulfoglucosinolate mittels Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie (HPLC) .....	21
3.3.	Bestimmung der Glucosinolat-Abbauprodukte .....	21
3.3.1.	Homogenatherstellung .....	21
3.3.2.	Analyse der Glucosinolat-Abbauprodukte mittels Gaschromatographie (GC) ..	22
3.4.	Expressionsanalyse .....	23
3.4.1.	Isolierung und Evaluierung von RNA .....	23
3.4.2.	RT-PCR .....	23
3.4.3.	Klonierung von Produkten der RT-PCR .....	24
3.5.	Standardmethoden der Molekularbiologie .....	25
3.5.1.	Kryokulturen .....	25
3.5.2.	Herstellung kompetenter Zellen .....	25
3.5.3.	Transformation von kompetenten Zellen .....	26
3.5.4.	Restriktionsverdau .....	28

3.5.5.	Gateway-Klonierung .....	28
3.5.6.	Gelelektrophorese .....	32
3.5.7.	Agarose-Gel-Extraktion .....	32
3.5.8.	Isolierung der Plasmid-DNA .....	32
3.5.9.	Isolierung der Gesamt-DNA aus <i>R. radiobacter</i> .....	33
3.5.10.	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	34
3.5.11.	Sequenzierung .....	34
3.6.	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> .....	34
3.6.1.	Anzucht von <i>R. radiobacter</i> und Infiltration .....	34
3.6.2.	Infiltrationsschema .....	35
3.7.	Untersuchung von Blättern mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) .....	36
3.8.	Untersuchung von Pflanzenextrakten mittels cLSM .....	36
3.9.	Nachweis von Myrosinase- und NSP-Aktivität in transient transformiertem <i>N. benthamiana</i> .....	37
4.	Ergebnisse .....	38
4.1.	Einfluss der T-DNA-Insertion in <i>AtNSP1-AtNSP5</i> auf das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte in <i>A. thaliana</i> Col-0 .....	38
4.1.1.	Glucosinolat-Abbauprodukte in Samen des Wildtyps .....	38
4.1.2.	Expression von <i>AtNSP1-AtNSP5</i> in Samen des Wildtyps und der T-DNA-Mutanten .....	39
4.1.3.	Glucosinolat-Abbauprodukte in Samen der T-DNA-Mutanten .....	40
4.1.4.	Einfluss der Lagerungsdauer von Samen auf den Gehalt an Glucosinolaten und ihren Abbau in wässrigen Homogenaten .....	43
4.1.5.	Glucosinolat-Abbauprodukte in Keimlingen des Wildtyps .....	46
4.1.6.	Expression von <i>AtNSP1-AtNSP5</i> in Keimlingen des Wildtyps und der T-DNA-Mutanten .....	47
4.1.7.	Glucosinolat-Abbauprodukte in Keimlingen der T-DNA-Mutanten .....	49
4.2.	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation spezifizierender Proteine und ihrer Homologe .....	53
4.2.1.	Subzelluläre Lokalisation von <i>AtNSP1</i> .....	53
4.2.2.	Subzelluläre Lokalisation von <i>AtNSP2</i> .....	54
4.2.3.	Subzelluläre Lokalisation von <i>AtNSP4</i> .....	55
4.2.4.	Subzelluläre Lokalisation von <i>AtNSP5</i> .....	56
4.2.5.	Subzelluläre Lokalisation von <i>At3g07720</i> .....	57
4.2.6.	Subzelluläre Lokalisation von <i>TaTFP</i> .....	58
4.3.	Untersuchungen zur Interaktion von <i>TGG1</i> mit spezifizierenden Proteinen oder ihren Homologen .....	59

4.3.1.	Herangehensweise .....	59
4.3.2.	Interaktion zwischen TGG1 bzw. TGG-oSP und AtNSP3 .....	60
4.3.3.	TGG1 ohne Signalpeptid und AtNSP5 .....	70
4.3.4.	TGG1 ohne Signalpeptid und At3g07720 .....	73
5.	Diskussion.....	76
5.1.	Nitrile sind Hauptabbauprodukte der Glucosinolate in wässrigen Homogenaten der Samen und Keimlinge von <i>A. thaliana</i> Col-0.....	76
5.2.	Der Glucosinolatabbau im wässrigen Homogenat der Samen ist unvollständig .....	77
5.3.	AtNSP2 ist für die Nitrilbildung in Samen verantwortlich.....	78
5.4.	AtNSP1 ist in Keimlingen für die Nitrilbildung verantwortlich.....	79
5.5.	Spezifizierende Proteine sind im Cytosol lokalisiert.....	80
5.6.	Interaktionen zwischen TGG1 und spezifizierenden Proteinen sind <i>in planta</i> schwer nachzuweisen .....	81
6.	Zusammenfassung.....	85
7.	Literatur.....	VII
Anhang.....		XIX
A.1. Tabellen.....		XIX
A.2. Abbildungen .....		XXVIII

## Abkürzungsverzeichnis

AtESP	Epithionitril-spezififizierendes Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtNSP	Nitril-spezififizierendes Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>att</i>	<i>attachement</i>
BiFC	bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
<i>B. juncea</i>	<i>Brassica juncea</i>
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
4BZO	4-Benzoyloxybutyl
3BZO	3-Benzoyloxypropyl
cDNA	komplementäre DNA
cLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CLuc	C-Terminus der Luciferase
CN	Nitril
Cnx	Cofaktor der Nitratreduktase und Xanthindehydrogenase
Col-0	Columbia-0
Cvi	Cape Verde Islands
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESP	Epithionitril-spezififizierendes Protein
FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisationsdetektion
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GC	Gaschromatographie
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
<i>G. graminis</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Gus	$\beta$ -Glucuronidase
GusC	C-terminales Fragment der $\beta$ -Glucuronidase
GusN	N-terminales Fragment der $\beta$ -Glucuronidase
GW	Gateway
HF	High-Fidelity
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Isoamylalkohol
I3M	Indol-3-ylmethyl
IntC	C-terminales Fragment des Inteins
IntN	N-terminales Fragment des Inteins
IS	Interner Standard
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
LsTFP	Thiocyanat-formendes Protein aus <i>Lepidium sativum</i>
<i>L. sativum</i>	<i>Lepidium sativum</i>
Luc	Luciferase

mCYC	C-terminales Fragment von mCherry
mCYN	C-terminales Fragment von mCherry
MBP	Myrosinase-bindendes Protein
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MeOH	Methanol
1MOI3M	1-Methoxyindol-3-ylmethyl
4MOI3M	4-Methoxyindol-3-ylmethyl
MS	Massenspektrometrie
4MSOB	4-Methylsulfinylbutyl
7MSOH	7-Methylsulfinylheptyl
8MSOO	8-Methylsulfinyloctyl
3MSOP	3-Methylsulfinylpropyl
4MTB	4-Methylthiobutyl
7MTH	7-Methylthioheptyl
8MTO	8-Methylthiooctyl
5MTP	5-Methylthiopentyl
MW	Mittelwert
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NCS	Isothiocyanat
NLuc	N-Terminus der Luciferase
NSP	Nitril-spezififizierendes Protein
OD <sub>580/ 600</sub>	Optische Dichte bei 580/ 600 nm
pOHb	4-Hydroxybenzyl
4OHI3M	4-Hydroxyindol-3-ylmethyl
4OHb	4-Hydroxybutyl
3OHP	3-Hydroxypropyl
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDest	Destinationsvektor
pDONR	Donorvektor
pENTRY	Entryvektor
pExp	Expressionsvektor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RF	Responsefaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reverse-phase</i>
<i>R. radiobacter</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<i>S. alba</i>	<i>Sinapis alba</i>
SCYCE	C-Terminus des Super Cyan-fluoreszierenden Proteins
SCFP	Super Cyan fluoreszierendes Protein
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>
TaTFP	Thiocyanat-formendes Protein aus <i>Thlaspi arvense</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer

## Abkürzungsverzeichnis

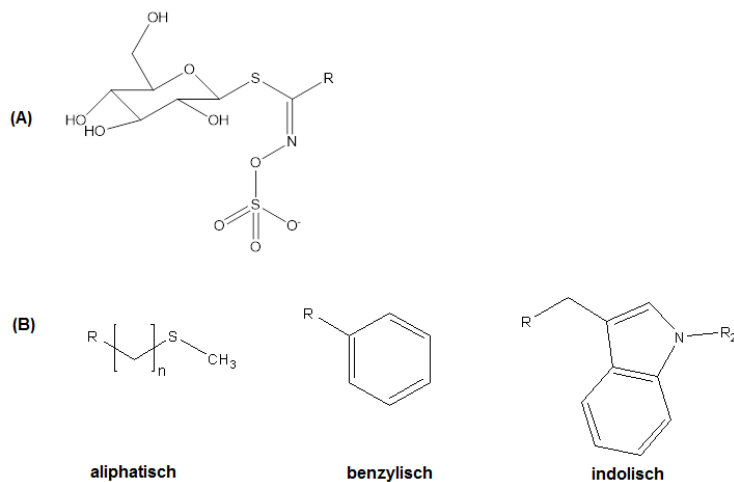
---

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TFP	Thiocyanat-formendes Protein
TG	Trockengewicht
TGG1-oSP	TGG1 ohne Signalpeptid
UV	Ultraviolet
VT	Volumenteil
VYNE	N-Terminus von Venus
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
Y2H	Yeast two-hybrid
Zeo	Zeocin

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Glucosinolat-Myrosinase-System

Charakteristisch für die Ordnung Brassicales ist das Vorkommen von Glucosinolaten, auch Senfölglykoside genannt. Zu den Brassicales gehören wichtige Nutzpflanzen der Familie Brassicaceae wie Raps und Kohl sowie die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* [Sønderby et al., 2010]. Mehr als 130 Glucosinolate wurden in Brassicaceae identifiziert [Fahey et al., 2001]. Glucosinolate gelten als ungiftig, erst durch Initiation des Myrosinase-katalysierten Glucosinolatabbaus entstehen giftige Produkte wie Isothiocyanate, die zur Verteidigung der Pflanzen dienen [Matile, 1980; Wittstock und Halkier, 2002]. Auch der scharfe Geschmack, der beim Kauen von z.B. Meerrettich auftritt, wird durch die Abbauprodukte erzeugt [Matile, 1980]. Den Abbauprodukten werden u.a. Krebs-präventive und antibakterielle Wirkungen zugesprochen [Halkier und Gershenzon, 2006; Traka und Mithen, 2009; Sønderby et al., 2010]. Untersuchungen zu den Reaktionen des Glucosinolatabbaus sind somit wichtig und von großem Interesse.



**Abbildung 1: Struktur der Glucosinolate.** Glucosinolate sind 1- $\beta$ -D-Thioglykoside (A). Ihre Grundstruktur beinhaltet eine Zuckerkomponente (Glucose), die thioglykosidisch an einen Z-konfigurierten N-Hydroximosulfatester gebunden ist. An das zentrale Kohlenstoffatom des N-Hydroximosulfatesters ist eine variable Seitenkette (R) gebunden, die aus einer Aminosäure stammt. In Abhängigkeit von der Aminosäure werden die Glucosinolate in drei Gruppen unterteilt (B; R = Glucosinolat-Grundstruktur).

Die Grundstruktur aller Glucosinolate beinhaltet einen Glucoserest, der über ein Schwefelatom an einen (Z)-N-Hydroximosulfatester gebunden ist (Abb. 1) [Halkier und Gershenzon, 2006]. An dem Aldoxim befindet sich eine variable Seitenkette, Aldoxim und Seitenkette leitet sich aus einer Vorläufer-Aminosäure ab (Abb. 1) [Halkier und Gershenzon, 2006]. Unterteilt werden Glucosinolate in aliphatische, benzyliche und indolische Glucosinolate (Abb. 1) [Halkier und Gershenzon, 2006]. Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin und Methionin liefern die Seitenkette aliphatischer Glucosinolate, Tryptophan die der Indol-Glucosinolate und Phenylalanin oder Tyrosin die der benzylichen Glucosinolate [Halkier und Gershenzon, 2006]. Die Biosynthese der Glucosinolate besteht aus drei Schritten: Im ersten Schritt kann die Seitenkette der Aminosäuren verlängert werden, im zweiten Schritt wird der Grundkörper der Glucosinolate gebildet und im dritten Schritt wird die Seitenkette durch Oxygenierung, Hydroxylierung, Alkenylierung, Benzylierung oder Methoxylierung modifiziert [Sønderby et al., 2010].

Das Glucosinolat-Myrosinase-System ist ein Verteidigungssystem der Brassicales gegenüber Herbivoren und Pathogenen. Glucosinolate und Myrosinase sind in der Pflanze in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert (siehe 1.3.) und kommen erst bei Gewebeverletzung miteinander in Kontakt [Matile, 1980]. Daher findet die Aktivierung des

Glucosinolat-Myrosinase-Systeme nur an der Stelle der Pflanze statt, wo der Angriff, d.h. eine Beschädigung des Pflanzengewebes z.B. durch einen Fraßfeind, erfolgt. Bei der Aktivierung spaltet die Myrosinase die thioglykosidische Bindung, D-Glucose wird abgespalten und ein instabiles Aglykon entsteht (Abb. 2) [Rask et al., 2000; Halkier und Gershenzon, 2006]. Durch eine Lossen-ähnliche-Umlagerung wird aus dem Aglykon das Isothiocyanat gebildet (Abb. 2) [Halkier und Gershenzon, 2006]. Neben Isothiocyanaten können auch andere Abbauprodukte entstehen.

Das Enzym Myrosinase ist eine Thioglykosid-Glucohydrolase (EC 3.2.1.147). Myrosinasen haben oft ein breites Substratspektrum, jedoch unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Glucosinolaten [Björkman und Lönnerdal, 1973; Rask et al., 2000]. Alle Myrosinasen sind glykosyliert [Burmeister et al., 1997; Rask et al., 2000] und werden vermutlich über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat gebildet. Für den N-Terminus der Myrosinase lässt sich daher ein Signalpeptid für das ER-Targeting vorhersagen, z.B. für die Myrosinase TGG1 aus *A. thaliana* die ersten neunzehn Aminosäuren [Andersson et al., 2009]. Vermutet wird, dass die Glykosylierung wichtig für die Stabilität der Myrosinase ist und als Schutz vor Abbau dient [Nastruzzi et al., 1996; Burmeister et al., 1997; Zhou et al., 2012].

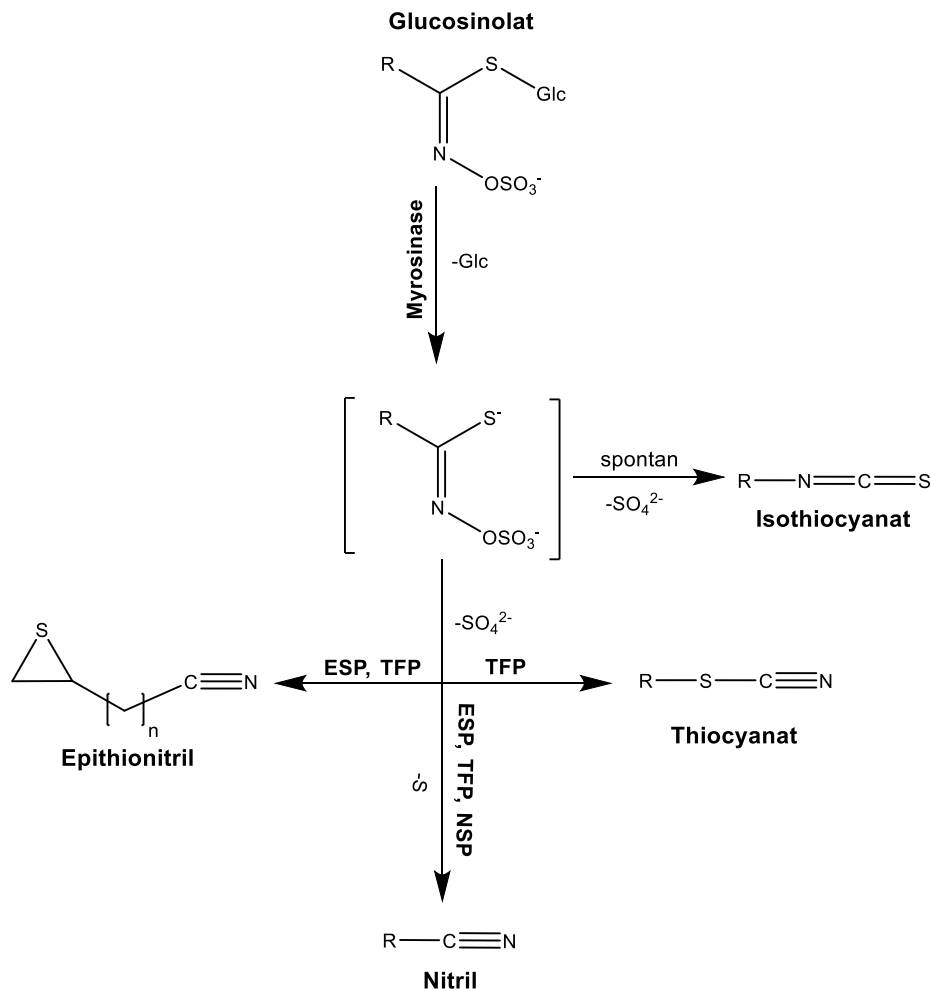
Das Spektrum der Abbauprodukte hängt von der chemischen Struktur der Glucosinolat-Seitenkette, den Reaktionsbedingungen und der Anwesenheit von spezifizierenden Proteinen ab [Wittstock und Halkier, 2002; Halkier und Gershenzon, 2006]. Glucosinate mit einer  $\beta$ -hydroxylierten Seitenkette bilden instabile Isothiocyanate, die spontan zum Oxazolidin-2-thion zyklisieren [Halkier und Du, 1997; Halkier und Gershenzon, 2006]. Indol-Glucosinate bilden ebenfalls instabile Isothiocyanate [Chew 1988; Agerbirk et al., 2009]. Zum Beispiel zerfällt das Isothiocyanat des Indol-3-ylmethyl (I3M)-Glucosinolats in wässrigem Milieu u.a. in Indol-3-carbinol [Agerbirk et al., 1998; Agerbirk et al., 2009]. In Anwesenheit spezifizierender Proteine wie des Epithionitril-spezifisierenden Proteins (ESP) [Tookey, 1973], des Thiocyanat-formenden Proteins (TFP) [Burow et al., 2007b; Kuchernig et al., 2011] oder des Nitril-spezifisierenden Proteins (NSP) [Burow et al., 2009; Kissen und Bones, 2009] entstehen auf Kosten des Isothiocyanats alternative Abbauprodukte wie Nitril, Epithionitril oder Thiocyanat (Abb. 2) [Wittstock und Burow, 2007; Wittstock und Burow, 2010]. Spezifizierende Proteine sind Kelch-Proteine [Kuchernig et al., 2012]. Sie sind aus mehreren  $\beta$ -Faltblatt-Domänen aufgebaut, die zu einem  $\beta$ -Propeller angeordnet sind. Die Kristallstruktur von ESP aus *A. thaliana* (AtESP) sowie TFP aus *Thlaspi arvense* (TaTFP) ist bekannt [Gumz et al., 2015; Zhang et al., 2016]. Bei TaTFP und AtESP handelt es sich um Homodimere und jedes TaTFP- bzw. AtESP-Monomer enthält sechs Kelch-Domänen [Gumz et al., 2015; Zhang et al., 2016]. Für die NSPs aus *A. thaliana* (AtNSP) wird ebenfalls eine Proteinstruktur aus sechs Kelch-Domänen angenommen. Einige NSPs verfügen zusätzlich über eine oder zwei N-terminale Jacalin-ähnliche Lektindomänen [Kuchernig et al., 2012]. Spezifizierende Proteine besitzen selber keine enzymatische Aktivität gegenüber den Glucosinolaten [Chew, 1988; Wittstock und Burow, 2007], sondern beeinflussen die Produktbildung infolge der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse [Wittstock und Burow, 2007]. Die Aktivität der spezifizierenden Proteine kann durch Zugabe von zweiwertigem Eisen gesteigert werden [Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2007b; Burow et al., 2009; Kissen und Bones, 2009; Kuchernig et al., 2011; Kong et al., 2012]. Für rekombinantes AtESP wurde gezeigt, dass die Bildung des Epithionitrils von zweiwertigem Eisen abhängig ist [de Torres Zabala et al., 2005; Burow et al., 2006b], während aufgereinigte rekombinante TFPs und



NSPs nach Zugabe von Chelatoren noch aktiv waren [Burow et al., 2007b; Burow et al., 2009; Kuchernig et al., 2011].

ESP führt in Abhängigkeit von der Glucosinolat-Seitenkette und in Anwesenheit der Myrosinase zur Bildung von Epithionitril oder einfachem Nitril [Tookey, 1973; Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2006b; Wentzell und Kliebenstein, 2008], während NSPs nur einfache Nitrile erzeugen (Abb. 2) [Burow et al., 2009; Kissen und Bones, 2009]. TFP bildet in Abhängigkeit von der Glucosinolat-Seitenkette und in Anwesenheit der Myrosinase einfache Nitrile, Epithionitrile oder Thiocyanate (Abb. 2) [Burow et al., 2007b; Burow und Wittstock, 2009; Kuchernig et al., 2011]. Bei Epithionitrilen handelt es sich um Nitrile mit einem terminalen Thiiran [Halkier und Gershenzon, 2006], einem schwefelhaltigen dreigliedrigen Heterozyklus. Die Bildung von Epithionitrilen erfordert eine terminale Doppelbindung in der aliphatischen Glucosinolat-Seitenkette [Chew, 1988; Halkier und Gershenzon, 2006]. Rekombinantes AtESP im *E. coli*-Rohextrakt und in aufgereinigter Form wandelt Allylglucosinolat sowie 2-Hydroxy-3-Butenyl-Glucosinolat im Zuge des Myrosinase-katalysierten Abbaus in das entsprechende Epithionitril um [Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2006b; Kong et al., 2012]. Alle anderen untersuchten Glucosinolate wurden in Anwesenheit von Myrosinase und AtESP zu Nitrilen abgebaut [Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2006b]. Thiocyanate können aus Allyl-, Benzyl- oder 4-Methylthiobutyl (4MTB)-Glucosinolat gebildet werden [Halkier und Gershenzon, 2006]. Rekombinantes TFP aus *Lepidium sativum* (LsTFP) im *E. coli*-Rohextrakt wandelt Benzylglucosinolat im Zuge des Myrosinase-katalysierten Abbaus in Benzylthiocyanat um, während aus 4MTB-Glucosinolat Nitril und aus Allylglucosinolat Nitril und Epithionitril gebildet werden [Burow et al., 2007b]. Versuche mit aufgereinigtem rekombinanten TaTFP zeigten, dass TaTFP in Anwesenheit der Myrosinase Allyl-, jedoch nicht Benzylglucosinolat, in das Thiocyanat überführt [Kuchernig et al., 2011]. 4MTB- und Benzylglucosinolat werden durch TaTFP und Myrosinase zum Nitril abgebaut [Kuchernig et al., 2011]. Untersuchungen mit aufgereinigten rekombinanten AtNSPs zeigten, dass Allyl-, Benzyl- und I3M-Glucosinolat in Anwesenheit von Myrosinase und AtNSP1, AtNSP2 oder AtNSP5 zu Nitrilen abgebaut werden [Kong et al., 2012]. Nitrile können bei der Glucosinolat-Hydrolyse auch in Abwesenheit der spezifizierenden Proteine entstehen, wenn der pH-Wert im sauren Bereich liegt oder zweiwertiges Eisen vorhanden ist [Gil und MacLeod, 1980; Uda et al., 1986; Chew, 1988].

Welche Rolle die einzelnen Abbauprodukte in der Pflanze spielen, ist bisher nicht vollständig geklärt. Isothiocyanate sind sehr reaktiv, reizend und giftig für viele Organismen wie Nematoden oder herbivore Insekten und sind Komponenten der direkten Abwehr [Wittstock et al., 2003]. Über die biologischen Effekte der alternativen Abbauprodukte ist wenig bekannt [Burow und Wittstock, 2009]. Für bestimmte Nitrile und Thiocyanate wurden toxische Effekte gegenüber Insekten gefunden [Wittstock et al., 2003]. Insgesamt gelten Nitrile als weniger giftig im Vergleich zu Isothiocyanaten [Lambrix et al., 2001; Wittstock et al., 2003; Burow und Wittstock, 2009]. Welche Vorteile die Pflanze aus der strikten Kontrolle des Glucosinolatabbaus zieht, ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass Nitrile für die indirekte Abwehr der Pflanze verantwortlich sind [Wittstock und Burow, 2010]. Diskutiert wird auch, ob eine gesteigerte Nitrilbildung in der Pflanze eine Rolle beim Glucosinolat-Turnover während der Samenkeimung spielt [Wentzell und Kliebenstein, 2008].



**Abbildung 2: Das Glucosinolat-Myrosinase-System in Brassicales.** Die Myrosinase überführt das Glucosinolat in ein instabiles Aglykon, das spontan über eine Lossen-ähnliche Umlagerung in giftiges Isothiocyanat umgewandelt wird [Halkier und Gershenzon, 2006]. In Anwesenheit des Epithionitril-spezififizierenden Proteins (ESP), des Nitril-spezififizierenden Proteins (NSP) oder des Thiocyanat-formenden Proteins (TFP) werden anstelle des Isothiocyanats Nitrile, Epithionitrile oder Thiocyanate gebildet [Wittstock und Burow, 2007; Wittstock und Burow, 2010].

## 1.2. Komponenten des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in *A. thaliana*

Für Untersuchungen des Glucosinolat-Myrosinase-Systems steht die Modellpflanze *A. thaliana*, Ackerschmalwand, zur Verfügung. Sie ist in der Forschung eine beliebte Modellpflanze, da sie einen kurzen Entwicklungszyklus von ungefähr sechs Wochen aufweist, ein sehr kleines Genom von rund 125 Megabasen besitzt und mit Hilfe des Bakteriums *Rhizobium radiobacter* leicht und effizient transformiert werden kann [Sofo, 2015]. Außerdem stehen umfangreiche Mutantensammlungen zu Verfügung.

In *A. thaliana* kommen bis zu 40 verschiedene Glucosinolate vor (Tab. 1) [Hogge et al., 1988; Haughn et al., 1991; Reichelt et al., 2002; Brown et al., 2003; Kliebenstein et al., 2007]. Die Zusammensetzung der Glucosinolate ist in jedem Organ und Entwicklungsstadium der Pflanze anders [Hogge et al., 1988; Petersen et al., 2002; Brown et al., 2003]. In der Pflanze finden Transport und Verteilung der Glucosinolate über das Phloem

statt [Chen et al., 2001]. Samen bilden Glucosinolate selber nur in geringen Mengen, der Hauptteil wird in Schotenwänden synthetisiert [Du und Halkier, 1998] und anschließend über die Glucosinolat-Transporter GTR1 und GTR2 in die Samen transportiert [Nour-Eldin et al., 2012]. GTR1 soll für die Verteilung der Glucosinolate im Blatt, möglicherweise auch für den Transport in S-Zellen verantwortlich sein, GTR2 für die apoplastische Phloem-Beladung der Glucosinolate [Nour-Eldin et al., 2012].

**Tabelle 1: Seitenketten der in *A. thaliana* Col-0 vorkommenden Glucosinolate.**

Glucosinolat	Abkürzung
3-Methylsulfinylpropyl-	3MSOP
4-Methylsulfinylbutyl-	4MSOB
7-Methylsulfinylheptyl-	7MSOH
8-Methylsulfinyloctyl-	8MSOO
4-Methylthiobutyl-	4MTB
5-Methylthiopentyl-	5MTP
7-Methylthioheptyl-	7MTH
8-Methylthiooctyl-	8MTO
3-Hydroxypropyl-	3OHP
4-Hydroxybutyl-	4OHB
3-Benzoyloxypropyl-	3BZO
4-Benzoyloxybutyl-	4BZO
Indol-3-ylmethyl-	I3M
1-Methoxyindol-3-ylmethyl-	1MOI3M
4-Methoxyindol-3-ylmethyl-	4MOI3M
4-Hydroxyindol-3-ylmethyl-	4OHI3M

In Keimlingen, jüngeren Pflanzen und reifen Rosettenblättern des *A. thaliana* Ökotyps Columbia-0 (Col-0) kommen überwiegend aliphatische Glucosinolate vor [Hogge et al., 1988; Petersen et al., 2002]. Hauptglucosinolate in Keimblättern sind 4MTB- und 4-Methylsulfinylbutyl (4MSOB)-Glucosinolat [Petersen et al., 2002]. Der Gesamtgehalt an Glucosinolaten ist in Keimwurzeln deutlich niedriger als in Keimblättern, mit zunehmendem Alter der Pflanze weisen Rosettenblätter und Wurzeln ähnliche Glucosinolatmengen auf [Petersen et al., 2002]. In Rosettenblättern jüngerer und älterer Pflanzen, in Stängeln und Blütenstielen ist 4MSOB-Glucosinolat das Hauptglucosinolat [Petersen et al., 2002; Brown et al., 2003; Koroleva et al., 2010; Falk et al., 2014]. Im Vergleich zu anderen Organen weisen die Stängel von Col-0 nur niedrige Mengen an Glucosinolaten auf [Petersen et al., 2002]. In Wurzeln kommen hohe Mengen an 1-Methoxyindol-3-ylmethyl (1MOI3M)-Glucosinolat vor [Petersen et al., 2002; Brown et al., 2003]. Mit zunehmendem Alter der Wurzel steigt der Gehalt an 1MOI3M-Glucosinolat an, in älteren Wurzeln ist neben 1MOI3M- auch 4MSOB-Glucosinolat als Hauptglucosinolat zu finden [Petersen et al., 2002]. In Schoten und Samen von Col-0 ist der Gesamtgehalt an Glucosinolaten am höchsten [Petersen et al., 2002]. Hauptglucosinolat in Schoten ist 4MSOB-Glucosinolat, in Samen 4MTB-Glucosinolat [Petersen et al., 2002; Brown et al., 2003]. Charakteristisch für die Samen von Col-0 ist das Vorkommen von benzoylierten Glucosinolaten, z.B. 3-Benzoyloxybutyl (3BZO)- und 4-Benzoyloxybutyl (4BZO)-Glucosinolat [Hogge et al., 1988; Petersen et al., 2002; Brown et al., 2003]. Der Glucosinolatgesamtgehalt ist in Keimlingen deutlich niedriger als in Samen [Petersen et al., 2002; Brown et al., 2003]. Die Abnahme des Glucosinolatgesamtgehalts von Samen über Keimlinge bis hin zum Rosettenstadium wurde mittels radioaktiv-markiertem 4-Hydroxybenzyl (*p*OHB)-Glucosinolat dokumentiert [Petersen et al., 2002]. Diskutiert wird, ob die Samen Glucosinolate speichern, damit diese in späteren Stadien der Keimung genutzt

werden können [Andréasson et al., 2001]. Es wird ein Glucosinolatabbau in intaktem Gewebe diskutiert, der die Abnahme der Glucosinolatgesamtmenge beim Übergang von Samen zu Keimlingen erklären könnte [Peterson et al., 2002; Brown et al., 2003; Wittstock und Burow, 2010].

In *A. thaliana* kommen sechs Myrosinase-Gene (*TGG1-TGG6*) vor. *TGG1* (At5g26000)- und *TGG2* (At5g25980)-Transkripte wurden in oberirdischen Organen wie Blättern, Blüten, Keimblättern, Schoten und Stängel mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen [Zhang et al., 2002; Fu et al., 2016]. Mittels RT-PCR wurde auch gezeigt, dass die Expression von *TGG4* (At1g47600) und *TGG5* (At1g47600) auf die Wurzeln begrenzt ist [Originalquelle beschrieben in Andersson et al., 2009; Fu et al., 2016]. *TGG4* und *TGG5* sollen neben ihrer Rolle im Glucosinolatabbau an der Regulierung des Wurzelwachstums sowie der Auxin-Biosynthese beteiligt sein [Fu et al., 2016]. *TGG3* und *TGG6* sind Pseudogene [Zhang et al., 2002; Wang et al., 2009].

Im Gegensatz zu den Glucosinolaten ist über die Profile der Glucosinolat-Abbauprodukte in den verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien von *A. thaliana* Col-0 wenig bekannt. In *A. thaliana* Col-0 werden organspezifisch zwei Typen von Abbauprodukten gebildet: Isothiocyanate und Nitrile. Im Homogenat der Keimlinge von Col-0 wurde das exogene Allylglucosinolat vorwiegend in das Nitril überführt [Wentzell und Kliebenstein, 2008]. Die Analyse des endogenen 4MSOB-Glucosinolats in Homogenaten der Keimlinge zeigte ebenfalls einen vorherrschenden Abbau zum Nitril [Wentzell und Kliebenstein, 2008]. Auch in Wurzelhomogenaten wurden nach Zugabe von exogenem Allyl- sowie Benzylglucosinolat hohe Nitril- und nur geringe Isothiocyanatmengen detektiert [Wentzell und Kliebenstein, 2008]. Im Gegensatz dazu wurde exogenes Allylglucosinolat in Homogenaten der Blüten, Stängel- und Rosettenblätter vorwiegend zum Isothiocyanat abgebaut [Wentzell und Kliebenstein, 2008]. Eine Bestimmung der Abbauprodukte endogener Glucosinolate in Homogenaten der Rosettenblätter und Blütenstände bestätigte, dass endogene Glucosinolate vor allem zu Isothiocyanaten abgebaut werden [Lambrix et al., 2001; Falk et al., 2014]. Die überwiegende Bildung von Nitrilen im Zuge des Myrosinase-katalysierten Glucosinolatabbaus deutet auf eine Beteiligung von NSPs hin. Das Genom von *A. thaliana* Col-0 enthält fünf *NSP*-Gene (*AtNSP1-AtNSP5*) [Burow et al., 2009; Kissen und Bones, 2009]. Zwar wurde in Col-0 ein *AtESP*-Transkript nachgewiesen, jedoch kein ESP-Protein und auch keine ESP-Aktivität [Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2007; Kissen et al., 2012]. Somit scheint *AtESP* in Col-0 nicht funktionell zu sein. Im Gegensatz zu Col-0 besitzen die *A. thaliana* Ökotypen Landsberg *erecta* (Ler) und Cape Verde Islands (Cvi) ein funktionsfähiges ESP [Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2007].

*AtNSP1*, *AtNSP3* und *AtNSP4* sind sogenannte Tandem-Gene. Sie sind im Genom direkt zueinander benachbart und weisen eine sehr hohe Nukleotid-Sequenz-Identität von 85-90 % auf [Kuchernig, 2012]. In Microarray-Analysen kann daher meist nicht zwischen diesen drei Genen differenziert werden. Mit einer *AtNSP1/ AtNSP3/ AtNSP4*-Sonde wurde in Microarray-Analysen in allen Organen, besonders aber in Wurzeln und Keimlingen, eine Expression von *AtNSP1/ AtNSP3 /AtNSP4* gefunden [Kissen und Bones, 2009]. Ob alle drei Gene gleichermaßen exprimiert werden, ist nicht bekannt. Auf Basis von Microarray-Daten wird *AtNSP2* in Samen und *AtNSP5* in allen Organen exprimiert [Kissen und Bones, 2009]. Expressionsanalysen mit alternativen Methoden wurden bislang nicht publiziert.

Der Zusammenhang zwischen der Expression von *AtNSPs* und der Nitrilbildung ist nur für die Rosettenblätter von *A. thaliana* Col-0 hinreichend untersucht. Es zeigte sich, dass eine T-

DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*) sich auf das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte im Homogenat der Rosettenblätter auswirkte: Im Homogenat von *nsp1-1* wurden nur Isothiocyanate des 3MSOP-, 4MSOB- und 4MTB-Glucosinolats detektiert, während im Homogenat des Wildtyps auch die korrespondierenden Nitrile nachgewiesen wurden [Burow et al., 2009]. Somit wurde gezeigt, dass *AtNSP1* in Rosettenblättern für die Nitrilbildung verantwortlich ist [Burow et al., 2009].

T-DNA-Mutanten standen auch für *AtNSP2-AtNSP5* zur Verfügung, jedoch wurden diese bisher noch nicht vollständig charakterisiert. Es wurden aber erste interessante Hinweise gewonnen. Das Expressionsniveau von *AtNSP1-AtNSP5* wurde bisher weder in Keimlingen des Wildtyps noch in Keimlingen von T-DNA-Mutanten analysiert. Untersuchungen in Keimlingen zeigten, dass die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*) sich auf das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte auswirkte: Im Homogenat von *nsp1-1* wurde signifikant weniger Nitril des 4MTB-Glucosinolats und signifikant mehr korrespondierendes Isothiocyanat als im Homogenat des Wildtyps detektiert [Dörr, 2014]. Dies deutete darauf hin, dass *AtNSP1* in Keimlingen für die Nitrilbildung verantwortlich ist [Dörr, 2014]. Da aber noch Nitrile im Homogenat der Keimlinge von *nsp1-1* detektiert wurden [Dörr, 2014], scheinen weitere *AtNSPs* in Keimlingen an der Nitrilbildung beteiligt zu sein. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die T-DNA-Insertion in *AtNSP2*, *AtNSP3* und *AtNSP5* zu keiner signifikanten Veränderung im Gehalt des Nitrils von 4MTB-Glucosinolat im Homogenat der Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp führte [Dörr, 2014]. Damit scheinen *AtNSP2*, *AtNSP3* und *AtNSP5* keinen Einfluss auf die Nitrilbildung in Keimlingen zu haben. Eine T-DNA-Mutante für *AtNSP4* wurde bisher nicht untersucht.

Untersuchungen zum Glucosinolatabbau im Homogenat von Samen wurden bisher nur mit Samenchargen unterschiedlichen Alters durchgeführt [Dörr, 2014]. Insbesondere waren die Samen des Wildtyps deutlich länger gelagert worden als die Samen der T-DNA-Mutanten [Dörr, 2014]. Die Daten ließen sich daher nicht interpretieren [Dörr, 2014].

Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass sich *AtNSP1-AtNSP5* vermutlich aus dem Vorläufer *At3g07720* entwickelt haben [Burow et al., 2009]. *At3g07720* kodiert für ein Kelch-Protein, für das bisher keine Aktivität als NSP gezeigt werden konnte [Burow et al., 2009]. Ihm wird eine Funktion außerhalb des Glucosinolat-Myrosinase-Systems zugesprochen. *At3g07720* soll eine Funktion in der Anpassung der Pflanze an Eisenmangel besitzen: Unter Eisenmangel war das *At3g07720*-Transkript in Wurzeln von *A. thaliana* hochreguliert [Buckhout et al., 2009; Stein und Waters, 2012; Urzica et al., 2012]. Auf Basis von Microarray-Daten wird *At3g07720* in allen Organen, vor allem in Keimwurzeln und Kelchblättern, exprimiert [Kissen und Bones, 2009].

### **1.3. Kompartimentierung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems**

#### **1.3.1. Vorkommen der Myrosinase**

1884 wurden erstmals Eiweißstoffe in Idioblasten der Brassicaceae mittels Millon's Reagenz nachgewiesen [Heinricher, 1884]. Diese Eiweißstoffe wurden als Myrosin und die Idioblasten als Myrosinzellen bezeichnet [Andréasson und Jørgensen, 2003]. Später wurde geklärt, dass es sich bei Myrosin um ein Enzym mit Thioglucosidase-Aktivität handelt [Guignard, 1890; Peche, 1913], für das der Name Myrosinase eingeführt wurde. Myrosinzellen kommen nicht

nur in der Familie der Brassicaceae vor, sondern auch in anderen Pflanzenfamilien der Ordnung Brassicales, wie Botaceae, Capparaceae oder auch Tropaeolaceae [Jørgensen, 1981]. Myrosinzellen sind länglich und zumeist größer als die umgebenden Zellen [Iversen et al., 1979]. Sie kommen unter anderem im Parenchym vor [Heinricher, 1884; Andréasson et al., 2001]. Myrosinzellen enthalten mit Myrosinase gefüllte Vakuolen, die als Myrosinkörner bezeichnet werden [Thangstad et al., 1991; Höglund et al., 1992; Andréasson et al., 2001; Ueda et al., 2006]. Die kugelförmigen Myrosinkörner enthalten elektronendichtes Material und machen den Hauptteil der Myrosinzellen aus [Iversen et al., 1979]. Später wurden neben histochemischen Nachweisen auch immunhistochemische Methoden unter Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen eine oder mehrere Myrosinase-Isoformen zur Identifizierung der Myrosinzellen verwendet [u.a. Thangstad et al., 1990, Thangstad et al., 1991; Höglund et al., 1991]. Ein Vergleich zwischen histochemischer und immunhistochemischer Nachweismethode zeigte die Identifizierung des gleichen Zelltyps, der Myrosinzellen, in *Brassica napus* [Höglund et al., 1991].

1913 wurde die Myrosinase auf zellulärer Ebene mit Hilfe von mikrochemischen Nachweismethoden in Myrosinzellen nachgewiesen [Peche, 1913]. Die Lokalisation der Myrosinase in Myrosinzellen wurde in vielen Untersuchungen mit Brassicaceae bestätigt [u.a. Bones et al., 1991; Thangstad et al., 1991; Höglund et al., 1992; Andréasson et al., 2001; Husebye et al., 2002]. Jedoch scheint das Vorkommen der Myrosinase nicht auf Myrosinzellen begrenzt zu sein: In Wurzeln von *L. sativum* wurde Myrosinase-Aktivität nachgewiesen, jedoch wurden keine Myrosinzellen gefunden [Iversen et al., 1979]. Die Wurzelschnitte wurden mit 1 % Uranylacetat angefärbt und unter dem Elektronenmikroskop ausgewertet [Iversen et al., 1979]. In Samen verschiedener Brassica-Arten z.B. *B. napus* wurde die Myrosinase mittels Millon's Reagenz in Aleuronkörnern nachgewiesen [Maheshwari et al., 1980]. In Keimblättern von *B. napus* wurde die Myrosinase immunhistochemisch in Schließzellen der Spaltöffnungen gefunden [Höglund et al., 1991]. In *A. thaliana* Col-0 wurde mit Hilfe von Myrosinasepromotor-Reportergen-Konstrukten TGG1-Promotoraktivität nicht nur in Myrosinzellen, sondern auch in Schließzellen der Spaltöffnungen nachgewiesen [Husebye et al., 2002; Thangstad et al., 2004; Barth und Jander, 2006]. Auch mittels Proteomanalyse wurde die Myrosinase als eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in Schließzellen identifiziert [Zhao et al., 2008].

Die subzelluläre Lokalisation der Myrosinase war einige Zeit umstritten. Zunächst wurde die Lokalisation der Myrosinase immunhistochemisch mit einem spezifischen Myrosinase-Antikörper und einem sekundären Antikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt war, in der Tonoplasten-ähnlichen Membran der Myrosinkörner von *B. napus* ermittelt [Thangstad et al., 1990]. Später wurde die Myrosinase mit der Immunogold-Elektronenmikroskopie im Inneren der Myrosinkörner u.a. von *A. thaliana*, *B. napus* und *Sinapis alba* lokalisiert [Thangstad et al., 1991; Höglund et al., 1992; Kelly et al., 1998; Andréasson et al., 2001; Ueda et al., 2006]. Die Ergebnisse stellten das Vorkommen der Myrosinase in der Tonoplasten-ähnlichen Membran in Frage [Höglund et al., 1992]. Während der auf der Peroxidase-Technik beruhende Nachweis zu einer breitflächigen Verteilung der Präzipitate um das Antigen herum führte und so eine exakte Auswertung erschwerte, ergibt die Nutzung von sekundären Antikörpern, die an Goldpartikel konjugiert sind, ein präziseres Ergebnis [Höglund et al., 1992]. Daher ist heute die Lokalisation der Myrosinase im Inneren der Myrosinkörner allgemein akzeptiert.

### 1.3.2. Vorkommen der Glucosinolate

In Brassicaceae sind Glucosinolate in Vakuolen gespeichert [u.a. Grob und Matile, 1979; Helmlinger et al., 1983; Kelly et al., 1998; Koroleva et al., 2000]. Die zelluläre Lokalisation der Glucosinolate wurde in Wurzeln von *Armoracia rusticana* über die Analyse der Bestandteile isolierter Vakuolen [Grob und Matile, 1979] oder über die Bestimmung von radioaktiv-markiertem Glucobrassicin im Vakuoleninhalt nach Zufütterung von [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Tryptophan [Helmlinger et al., 1983] ermittelt. In Keimblättern und Samen von *Brassica juncea* wurde ein spezifischer Antikörper gegen Allylglucosinolat eingesetzt [Kelly et al., 1998]. In *A. thaliana* wurden Glucosinolate in der Vakuole sogenannter S-Zellen nachgewiesen, indem die Glucosefreisetzung nach Inkubation des Zellsaftes einzelner S-Zellen mit Myrosinase bestimmt wurde [Koroleva et al., 2000]. S-Zellen zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an Schwefel aus. Der Gehalt an Schwefel in S-Zellen ist 19-mal höher als in umgebenden Zellen [Koroleva et al., 2010] und geht offenbar auf den hohen Glucosinolatgehalt zurück. Die S-Zellen sind unregelmäßig geformt, besitzen dünne Zellwände, eine große Vakuole und sind offenbar frei von Plastiden [Koroleva et al., 2000; Husebye et al., 2002; Koroleva et al., 2010]. In Blütenstielen, Rosetten- und Stängelblättern befinden sich die S-Zellen zwischen der Endodermis und der Phloemzone der Leitbündel [Koroleva et al., 2000; Koroleva et al., 2010] und damit in unmittelbarer Nähe zu den Myrosinzellen [Husebye et al., 2002]. In Schoten kommen S-Zellen in Randbereichen des Phloems vor [Sarsby et al., 2012]. Auch langgestreckte Zellen am äußeren Rand der reifen Rosettenblätter weisen einen hohen Gehalt an Schwefel auf [Koroleva et al., 2010], ebenso die Epidermiszellen der Kelchblätter [Sarsby et al., 2012]. Dies deutet auf eine Lokalisation der Glucosinolate in Epidermiszellen hin, die dort vermutlich als Abwehrbarriere dienen [Sarsby et al., 2012]. Schwefelhaltige Zellen, die ähnlich wie die S-Zellen aussehen, kommen entlang der Mittelrippe der Rosettenblätter sowie der Mittelrippe und der lateralen Adern der Stängelblätter vor [Koroleva et al., 2010]. S-Zellen wurden bisher nur in *A. thaliana* beschrieben. Ob diese charakteristischen Zellen auch in anderen Arten der Brassicaceae vorkommen, ist bisher nicht bekannt.

Neben der Kompartimentierung von Glucosinolaten und Myrosinase in verschiedenen Zellen wurde auch das Vorkommen von Glucosinolaten und Myrosinase in der Vakuole der gleichen Zellen beschrieben [Kelly et al., 1998; Koroleva und Cramer, 2011]. Die Colokalisation von Myrosinase und Glucosinolat in aleuronähnlichen Zellen der Samen und Keimlinge von *B. juncea* wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Myrosinase und Allylglucosinolat bestimmt [Kelly et al., 1998]. In Blütenstielen von *A. thaliana* wurde die Colokalisation über die massenspektrometrische Analyse des Zellsaftes einzelner S-Zellen bestimmt [Koroleva und Cramer, 2011]. Kommen Glucosinolate und Myrosinase zusammen in der Vakuole vor, wird der Glucosinolatabbau offenbar durch einen bisher unbekannten Mechanismus verhindert, da bei der Analyse des Zellsaftes nur geringe Mengen an Glucose als Indikator für den Myrosinase-katalysierten Glucosinolatabbau gefunden wurden [Koroleva und Cramer, 2011].

### 1.3.3. Vorkommen der spezifizierenden Proteine

Über die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der spezifizierenden Proteine ist wenig bekannt. Bisher wurde die subzelluläre Lokalisation von AtESP untersucht [Burow et al., 2007; Miao und Zentgraf, 2007]. Immuncytochemisch wurde unter Verwendung eines

spezifischen AtESP-Antikörpers ESP im Cytosol der Epidermiszellen von *A. thaliana* Ler lokalisiert [Burow et al., 2007]. Diskutiert wird zusätzlich eine Lokalisation von AtESP im Zellkern [Burow et al., 2007]. Studien, in denen Fusionskonstrukte aus AtESP und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) in Protoplasten von *A. thaliana* untersucht wurden, bestätigten die Lokalisation im Cytosol und deuteten ebenfalls eine Lokalisation von AtESP im Zellkern an [Miao und Zentgraf, 2007]. Auf zellulärer Ebene kommt ESP vorwiegend in Epidermiszellen aller oberirdischen Organe von *A. thaliana* Ler vor, mit Ausnahme der Antheren [Burow et al., 2007]. In S-Zellen der Blütenstiele von *A. thaliana* Ler sowie in S-Zellen der Blätter von *A. thaliana* Cvi wurde AtESP ebenfalls immunhistochemisch nachgewiesen [Burow et al., 2007]. Somit scheinen AtESP und Glucosinolate in einigen Organen in den gleichen Zellen lokalisiert zu sein.

Weitere Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation wurden bisher nur mit AtNSP3 durchgeführt. Dazu wurde AtNSP3 in N- oder C-terminaler Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus in *Nicotiana benthamiana* produziert [Gumz und Wittstock, unveröffentlichte Ergebnisse]. In beiden Fällen trat eine Venus-Fluoreszenz im Cytosol auf, sodass eine cytosolische Lokalisation von AtNSP3 angenommen wird [Gumz und Wittstock, unveröffentlichte Ergebnisse]. Da keines der bekannten spezifizierenden Proteine auf Basis von computergestützten Aminosäuresequenz-Analysen ein N-terminales Signalpeptid besitzt, geht man auch für die anderen bekannten spezifizierenden Proteine von einer cytosolischen Lokalisation aus.

### 1.4. Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierenden Proteinen

Spezifizierende Proteine weisen keine enzymatische Aktivität gegenüber den Glucosinolaten auf [Chew, 1988; Wittstock und Burow, 2007]. Ihre Anwesenheit führt bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse zur Bildung alternativer Abbauprodukte auf Kosten der Isothiocyanate [Wittstock und Burow, 2007]. Es wird davon ausgegangen, dass spezifizierende Proteine die Umwandlung des Aglykons in die alternativen Abbauprodukte katalysieren. Damit die Umlagerung des Aglykons in ein Isothiocyanat verhindert wird, muss eine räumliche Nähe zwischen Myrosinase und spezifizierendem Protein gegeben sein. Dies wurde experimentell mit aufgereinigtem rekombinanten ESP aus *A. thaliana* Ler bestätigt [Burow et al., 2006b]. Wurden Myrosinase und Allylglucosinolat durch eine Dialysemembran von AtESP getrennt, wurde nur Isothiocyanat gebildet, aber kein Epithionitril [Burow et al., 2006b]. Der Nachweis einer stabilen Interaktion zwischen Myrosinase und AtESP ist jedoch bisher nicht gelungen. Wurde ein Antikörper gegen AtESP an einer Säulenmatrix immobilisiert und anschließend mit gereinigtem rekombinanten AtESP gesättigt, kam es nach Beladung der Säule mit myrosinasehaltigem Blattextrakt nicht zur Coelution von Myrosinase und AtESP. Die Proteine eluierten in getrennten Fraktionen [Burow et al., 2006b]. Auch mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese eines Gemisches aus gereinigter Myrosinase aus Samen von *S. alba* und aufgereinigtem rekombinanten AtESP ließ sich kein Komplex aus Myrosinase und AtESP nachweisen [Burow et al., 2006b]. Möglicherweise ist die Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierendem Protein schwach bzw. kurzlebig.

*In vitro* wurde die Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierendem Protein mittels lichtinduziertem *label*-Transfer untersucht [Gumz, 2015]. Die Untersuchungen wurden mit aufgereinigtem rekombinanten AtNSP3 bzw. TaTFP durchgeführt [Gumz, 2015]. Die aus *S.*



*alba* aufgereinigte Myrosinase wurde mit dem Crosslinker Mts-Aft-Biotin markiert und unter Einwirkung von UV-Licht mit AtNSP3 bzw. TaTFP inkubiert. Die erfolgreiche Übertragung des Linkers von der Myrosinase auf AtNSP3 sowie TaTFP deutete die Annäherung der Interaktionspartner auf 11,1 Å an [Gumz, 2015]. Der Label-Transfer war auch erfolgreich, wenn die aufgereinigte rekombinante Mutante AtNSP3 ohne Jacalin-Domäne verwendet wurde [Gumz, 2015]. Daher scheint die Interaktion zwischen Myrosinase und AtNSP3 nicht von der Jacalin-ähnlichen Lektindomäne abhängig zu sein.

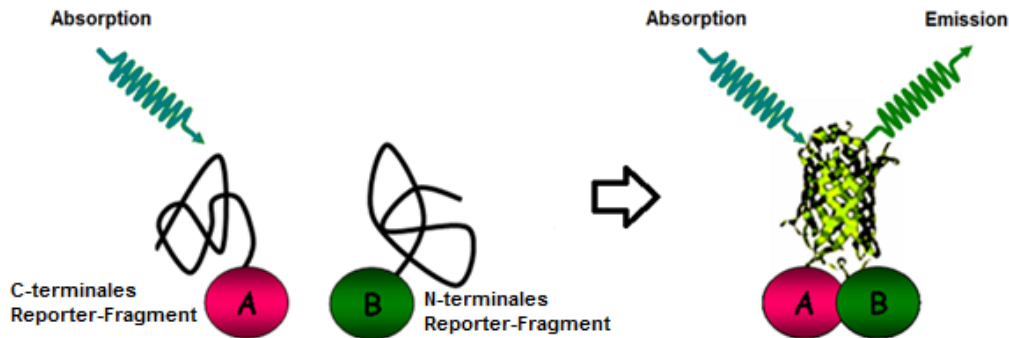
Nach erfolgreicher *in vitro*-Analyse sollte die Interaktion zwischen Myrosinase und AtNSP3 *in planta* mittels Proteinfragment-Komplementations-Assay untersucht werden. Das Prinzip beruht auf der Teilung eines Reporterproteins in ein N- und ein C-terminales Fragment [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Die N- und C-terminalen Fragmente werden mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Interagieren die zu untersuchenden Proteine miteinander, können sich die Fragmente des Reporterproteins wiederfinden und zusammensetzen [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Ein Nachweis der Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierenden Proteinen *in planta* ist jedoch schwierig, da Myrosinase und spezifizierende Proteine natürlicherweise meist nicht im gleichen Kompartiment vorkommen (siehe 1.3.). Erste *in vivo*-Untersuchungen wurden mittels Split-Luciferase (Luc)-Assay durchgeführt [Gumz, 2015]. Dazu wurden die Myrosinase TGG1 aus *A. thaliana* und AtNSP3 jeweils in Fusion mit dem C- oder N-terminalen Fragment der Luciferase in *N. benthamiana* produziert [Gumz, 2015]. Der Nachweis einer Interaktion gelang nicht [Gumz, 2015]. Dies könnte dadurch bedingt gewesen sein, dass die Interaktionspartner in verschiedenen Kompartimenten vorlagen. Wie Versuche mit Venus-Fusionsproteinen in transient transformiertem *N. benthamiana* zeigten, lagen AtNSP3-Venus und Venus-AtNSP3 im Cytosol vor, während Myrosinase-Venus in vesikelartigen Gebilden vorkam [Gumz und Wittstock, unveröffentlichte Ergebnisse]. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation wurden Luciferase-Komplementations-Assays im Blattextrakt durchgeführt, die aber ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis führten [Gumz, 2015]. Möglicherweise war die Interaktion zu kurzlebig, um bei reversibler Luciferase-Komplementierung Luciferase-Aktivität nachweisen zu können [Gumz, 2015].

### 1.5. Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in planta*

Neben Proteinfragment-Komplementations-Assays stehen weitere *in vivo* Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen zur Verfügung, z.B. das Yeast two-hybrid (Y2H)-System oder der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Im Y2H-System wird ein Transkriptionsfaktor verwendet, der eine DNA-Bindedomäne und eine Aktivator-Domäne aufweist [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Diese beiden Domänen werden voneinander getrennt, sodass der Transkriptionsfaktor funktionslos ist [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Die zu untersuchenden Proteine werden jeweils mit einer der beiden Domänen fusioniert [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Interagieren die zu untersuchenden Proteine miteinander, entsteht ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor und es kann zur Transkription von Reportergenen oder ausgewählten Markern kommen [Morsy et al., 2008]. Im Gegensatz zum Proteinfragment-Komplementations-Assay können im Y2H-System nur Interaktionen im Zellkern untersucht werden [Piehler, 2005].

Mittels FRET kann der strahlenlose Energietransfer von einem Donor- auf einen Akzeptor-Fluorophor bestimmt werden [Morsy et al., 2008]. Die Fluorophore sind mit den zu

untersuchenden Proteinen fusioniert [Morsy et al., 2008]. Für den Energietransfer muss der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren kleiner als 10 nm sein, was nur möglich ist, wenn die zu untersuchenden Proteine miteinander interagieren [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Detektiert werden kann die Veränderung der Emissionsintensität von Donor- und Akzeptor-Fluorophor oder die Fluoreszenz-Lebenszeit [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC).** Die auf Interaktion zu untersuchenden Proteine werden mit einem der beiden Reporter-Fragmente fusioniert. Interagieren die Proteine miteinander, können die Reporter-Fragmente sich wieder zusammenfinden und das Reporterprotein z.B. ein Fluoreszenzprotein wird rekonstituiert [Bath et al., 2006]. Eine Fluoreszenzemission kann gemessen werden [Bath et al., 2006]. Abbildung modifiziert nach Bath et al., 2006.

Neben dem Luciferase-Komplementations-Assay zählt die bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) zu den Proteinfragment-Komplementations-Assays [Piehler, 2005; Morsy et al., 2008]. Während beim Luciferase-Komplementations-Assay die Luciferase als Reporterprotein fungiert, nutzt man beim BiFC Fluoreszenzproteine wie GFP oder seine Derivate wie das gelb fluoreszierende Protein (YFP) [Bath et al., 2006]. Das Reporterprotein wird in zwei Fragmente unterteilt, die sich nicht wieder spontan komplementieren können [Bath et al., 2006]. Jedes Fragment wird mit einem der zu untersuchenden Proteine fusioniert. Interagieren die zu untersuchenden Proteine miteinander, wird das Reporterprotein rekonstituiert (Abb. 3). Bei Verwendung von GFP und seinen Derivaten wird dadurch eine Fluoreszenz messbar (Abb. 3) [Bath et al., 2006]. Die Rekonstitution des BiFC-Komplexes ist irreversibel [Bath et al., 2006]. Im Gegensatz dazu ist die Komplementation der Luciferase reversibel [Luker et al., 2004; Gehl et al., 2011]. Die Reversibilität der Luciferase-Komplementation könnte ein Grund dafür sein, dass mittels Split-Luc-Assay in Blattextrakten keine Interaktion zwischen Myrosinase und AtNSP3 messbar war (siehe 1.4). Wegen der möglichen Kurzlebigkeit des Interaktionskomplexes aus Myrosinase und spezifizierendem Protein könnte BiFC eine bessere Methode zum Nachweis der Interaktion sein, da ein einmal gebildeter Interaktionskomplex bestehen bleibt und somit auch kurzlebige Interaktionen sichtbar gemacht werden können.

### 1.6. Zielsetzung

Neben der Regulierung der Glucosinolat-Biosynthese wird auch das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte organspezifisch reguliert. Eine zentrale Rolle spielen dabei spezifizierende Proteine, die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Welche Rolle spielen individuelle AtNSPs für die Bildung der Glucosinolat-Abbauprodukte in Homogenaten der Samen und Keimlinge von *A. thaliana*? Samen und Keimlinge von T-DNA-Mutanten sollten phänotypisch charakterisiert werden. Zum einen sollte geprüft werden, welchen Einfluss die T-DNA-Insertion in einem der *AtNSP*-Gene auf die Expression des Zielgens und der anderen *AtNSP*-Gene hat. Zum anderen sollte das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte in Homogenaten von Samen und Keimlingen der T-DNA-Mutanten im Vergleich zum Homogenat des Wildtyps analysiert werden.
2. In welchem Kompartiment der Pflanzenzelle werden spezifizierende Proteine gespeichert? Hierfür sollten AtNSP1, AtNSP2, AtNSP4, AtNSP5, At3g07720 und TaTFP in N- sowie C-terminaler Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus in *N. benthamiana* produziert werden. Die Fluoreszenz in transformierten Blättern sollte mikroskopisch analysiert werden.
3. Kann die Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierenden Proteinen mittels BiFC *in planta* oder im Pflanzenextrakt nachgewiesen werden? Für *in planta*-Untersuchungen sollte durch Produktion der Myrosinase TGG1 ohne Signalpeptid (TGG1-oSP) in Fusion mit einem Reporterprotein-Fragment eine cytosolische Lokalisation in Blättern von *N. benthamiana* erreicht werden. Unter Coproduktion der entsprechenden Fusionsproteine von AtNSP3 sollten BiFC-Untersuchungen in Blattscheiben durchgeführt werden, auch wenn auf diese Weise auf die posttranslationale Modifikation der Myrosinase verzichtet wird. Neben AtNSP3 sollten als Interaktionspartner für die Myrosinase TGG1-oSP auch AtNSP5 und At3g07720 eingesetzt werden. Um die Interaktion mit einer posttranslational modifizierten Myrosinase untersuchen zu können, sollte die Myrosinase TGG1 mit Signalpeptid in C-terminaler Fusion mit einem Reporterprotein-Fragment in *N. benthamiana* produziert werden. Ihre Interaktion mit AtNSP3 in C-terminaler Fusion mit einem Reporterprotein-Fragment sollte in Blattextrakten nach getrennter Produktion und Kombination der Extrakte mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel stammten, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), VWR (Pennsylvania, USA) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Hamburg). Benzylglucosinolat wurde von Kathrin Meier (AG Wittstock) aus Kressesamen nach dem Protokoll von Zrybko et al., 1997 isoliert. Wenn nicht anders angegeben, wurde demineralisiertes Wasser verwendet.

Enzyme, Puffer und Zusätze für cDNA-Synthesen, PCR und Restriktions-Verdau wurden, soweit nicht anders beschrieben, von Thermo Fisher Scientific/Fermentas (Massachusetts, USA) bezogen. Die Primer wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei Invitrogen (USA) bestellt. Sie wurden in lyophilisierter Form geliefert und mit 10 mM Tris pH 8 zu 100 pmol/µl gelöst. Vor Verwendung wurden die Primer mit 10 mM Tris pH 8 auf 10 pmol/µl verdünnt. Die Primer sind im Anhang aufgelistet (Tab. A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8). Die Geräte sind Tabelle A9 zu entnehmen.

### 2.2. Plasmide

Plasmide, die zur Erzeugung der *attbB*-Produkte als Templates in der PCR verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die in der Arbeit verwendeten Donor- (pDONR) und Entryvektoren (pENTRY) sind in Tabelle 3 dargestellt, die Destinationsvektoren (pDest) in Tabelle 4. Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren (pExp) zu entnehmen.

**Tabelle 2: Plasmid-Templates zur Erzeugung der *attbB*-PCR-Produkte.**

Plasmide	Bemerkung	Referenz
pET52b(+) <i>modII_MBPV (NSP1)</i>	-	Burow et al., 2009
pET52b(+) <i>modII_MBPIII (NSP2)</i>	-	Burow et al., 2009
pET52b(+) <i>modII_MBPVI (NSP4)</i>	-	Burow et al., 2009
pET52b(+) <i>modII_MBPVI (NSP5)</i>	-	Burow et al., 2009
pENTRY_ <i>P2R-P3</i> (mCherry)	Kanamycin-Resistenz	Rumen Ivanov, Institut für Botanik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
pENTRY_ <i>tgg1_ohne stop</i> , pENTRY_ <i>atnsp3_ohne stop</i> , pENTRY_ <i>tatfp_ohne stop</i>	Zeocin-Resistenz	Frauke Gumz, AG Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig
pExp_ <i>cluc_cnx7_E6</i> , pExp_ <i>nluc_cnx6</i>	Kanamycin-Resistenz	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig

**Tabelle 3: Verwendete Donor- und Entryvektoren.** Der Donorvektor wurde in der BP-Reaktion eingesetzt, die Entryvektoren in der nachfolgenden LR-Reaktion. Das N-terminale Fragment des Fluoreszenzproteins mCherry wurde im Rahmen dieser Arbeit als mCYN bezeichnet, das C-terminale Fragment als mCYC. Cnx6 und Cnx7 sind *A. thaliana*-Proteine, die in der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese eine Rolle spielen [Kaufholdt et al., 2013].

Vektor	Resistenz	Referenz
pDONR/Zeo	Zeocin	Invitrogen
pENTRY_tgg1_ohnestop	Zeocin	Frauke Gumz, AG Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig
pENTRY_tgg1_mitstop	Zeocin	Frauke Gumz, AG Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig
pENTRY_tgg1_oSP_ohnestop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_tgg1_oSP_mitstop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_tgg1-mcyc	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp1_ohnestop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp1_mitstop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp2_ohnestop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp2_mitstop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp3_ohnestop	Zeocin	Frauke Gumz, AG Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig
pENTRY_atnsp3_mitstop	Zeocin	Frauke Gumz, AG Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig
pENTRY_atnsp3-mcyn	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp4_ohnestop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp4_mitstop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp5_ohnestop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_atnsp5_mitstop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_tatfp_ohnestop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_tatfp_mitstop	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_cnx6-mcyn	Zeocin	diese Arbeit
pENTRY_mcyc-cnx7	Zeocin	diese Arbeit

**Tabelle 4: Verwendete Destinationsvektoren.** Die Destinationsvektoren enthielten eine Gateway-Kassette (GW). Bei dem Reporter-Fragment VYNE handelt es sich um den N-Terminus des Fluoreszenzproteins Venus, bei dem Reporter-Fragment SCYCE um den C-Terminus des Super-Cyan-fluoreszierenden Proteins (SCFP) [Waadt et al., 2008; Gehl et al., 2009].

Vektor	Reporter	Fusion	Resistenz	Referenz
pDest_pK7WG2	-	-	Spectinomycin	VIB Departement of Plant Systems Biology, Universität Gent
pDest_GW-vyne	VYNE	C-terminal	Kanamycin	Gehl et al., 2009
pDest_vyne-GW	VYNE	N-terminal	Kanamycin	Gehl et al., 2009
pDest_GW-scyce	SCYCE	C-terminal	Kanamycin	Gehl et al., 2009
pDest_scyce-GW	SCYCE	N-terminal	Kanamycin	Gehl et al., 2009
pDest_GW-venus	Venus	C-terminal	Kanamycin	Gehl et al., 2009
pDest_venus-GW	Venus	N-terminal	Kanamycin	Gehl et al., 2009

**Tabelle 5: Verwendete Expressionsvektoren.** Die Destinationsvektoren, die zur Herstellung der Expressionsvektoren dienten, sind zusätzlich angegeben. Die Destinationsvektoren enthielten eine Gateway-Kassette (GW). Das N-terminale Fragment des Fluoreszenzproteins mCherry wurde im Rahmen dieser Arbeit als mCYN bezeichnet, das C-terminale Fragment als mCYC. Bei dem Reporter-Fragment VYNE handelt es sich um den N-Terminus des Fluoreszenzproteins Venus, bei dem Reporter-Fragment SCYCE um den C-Terminus von SCFP [Waadt et al., 2008; Gehl et al., 2009]. Cnx1, Cnx6 und Cnx7 sind *A. thaliana*-Proteine, die in der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese eine Rolle spielen [Kaufholdt et al., 2013]. CLuc ist der C-Terminus der Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* [Luker et al., 2004; Gehl et al., 2011]. EFP611 ist ein rot fluoreszierendes Protein aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* [Weidmann et al., 2002]. Fortsetzung der Tabelle auf S. 17.

Expressionsvektor	Destinationsvektor	Resistenz	Bemerkung	Referenz
pExp_tgg1-vyne	GW-vyne	Kanamycin	C-terminales VYNE	diese Arbeit
pExp_tgg1-scyce	GW-scyce	Kanamycin	C-terminales SCYCE	diese Arbeit
pExp_tgg1-mcyc	pK7WG2	Spectinomycin	C-terminales mCYC	diese Arbeit
pExp_tgg1_osp-scyce	GW-scyce	Kanamycin	C-terminales SCYCE	diese Arbeit
pExp_scyce-tgg1_osp	scyce-GW	Kanamycin	N-terminales SCYCE	diese Arbeit
pExp_tgg1_osp-vyne	GW-vyne	Kanamycin	C-terminales VYNE	diese Arbeit
pExp_vyne-tgg1_osp	vyne-GW	Kanamycin	N-terminales VYNE	diese Arbeit
pExp_tgg1_osp-venus	GW-venus	Kanamycin	C-terminales Venus	diese Arbeit
pExp_atnsp1-venus	GW-venus	Kanamycin	C-terminales Venus	diese Arbeit
pExp_venus-atnsp1	venus-GW	Kanamycin	N-terminales Venus	diese Arbeit
pExp_atnsp2-venus	GW-venus	Kanamycin	C-terminales Venus	diese Arbeit
pExp_venus-atnsp2	venus-GW	Kanamycin	N-terminales Venus	diese Arbeit
pExp_atnsp3-vyne	GW-vyne	Kanamycin	C-terminales VYNE	diese Arbeit
pExp_vyne-atnsp3	vyne-GW	Kanamycin	N-terminales VYNE	diese Arbeit
pExp_atnsp3-scyce	GW-scyce	Kanamycin	C-terminales SCYCE	diese Arbeit
pExp_scyce-atnsp3	scyce-GW	Kanamycin	N-terminales SCYCE	diese Arbeit
pExp_atnsp3-mcyn	pK7WG2	Spectinomycin	C-terminales mCYN	diese Arbeit
pExp_atnsp4-venus	GW-venus	Kanamycin	C-terminales Venus	diese Arbeit
pExp_venus-atnsp4	venus-GW	Kanamycin	N-terminales Venus	diese Arbeit
pExp_atnsp5-vyne	GW-vyne	Kanamycin	C-terminales VYNE	[Döring, 2016]
pExp_vyne-atnsp5	vyne-GW	Kanamycin	N-terminales VYNE	[Döring, 2016]

<b>pExp_atnsp5-venus</b>	<i>GW-venus</i>	Kanamycin	C-terminales Venus	diese Arbeit
<b>pExp_venus-atnsp5</b>	<i>venus-GW</i>	Kanamycin	N-terminales Venus	diese Arbeit
<b>pExp_at3g07720-vyne</b>	<i>GW-vyne</i>	Kanamycin	C-terminales VYNE	[Döring, 2016]
<b>pExp_at3g07720-venus</b>	<i>GW-venus</i>	Kanamycin	C-terminales Venus	[Döring, 2016]
<b>pExp_venus-at3g07720</b>	<i>venus-GW</i>	Kanamycin	N-terminales Venus	[Döring, 2016]
<b>pExp_cnx6-vyne</b>	<i>GW-vyne</i>	Kanamycin	C-terminales VYNE	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig
<b>pExp_cnx6-mcyn</b>	<i>pK7WG2</i>	Spectinomycin	C-terminales mCYN	diese Arbeit
<b>pExp_scyce-cnx7</b>	<i>scyce-GW</i>	Kanamycin	N-terminales SCYCE	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig
<b>pExp_mcy-cnx7</b>	<i>pK7WG2</i>	Spectinomycin	N-terminales mCYC	diese Arbeit
<b>pExp_cnx1-vyne</b>	<i>GW-vyne</i>	Kanamycin	C-terminales VYNE	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig
<b>pExp_cnx1-scyce</b>	<i>GW-scyce</i>	Kanamycin	C-terminales SCYCE	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig
<b>pExp_cluc-vyne</b>	<i>GW-vyne</i>	Kanamycin	C-terminales VYNE	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig
<b>pExp_cluc-scyce</b>	<i>GW-scyce</i>	Kanamycin	C-terminales SCYCE	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig
<b>pExp_eqfp611-scyce</b>	<i>GW-scyce</i>	Kanamycin	C-terminales SCYCE	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig

### 2.3. Bakterienstämme

Tabelle 6 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme zu entnehmen.

**Tabelle 6: Bakterienstämme mit Genotyp.**

<b>Name</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Quelle</b>
<b><i>E. coli</i> XL1 blue</b>	<i>recA1 endA11gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB lac<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene Cooperation (Agilent Technologies, Kalifornien, USA)
<b><i>E. coli</i> DH5α</b>	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYAargF) U169, hsdR17(rK-mK+), λ-</i>	AG Beerhues, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig
<b><i>R. radiobacter</i></b>	C58C1 T-DNA-, vir+ der Nopaline-Gruppe, Rif <sup>R</sup> , mit residentem pMP90-Gent <sup>R</sup>	AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig

## 2.4. Pflanzen

### 2.4.1. *Arabidopsis thaliana*

Für die Analyse der Samen und Keimlinge wurden Samen von *A. thaliana* Col-0 (John D'Auria, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena) und T-DNA-Insertionsmutanten, die ursprünglich aus dem European Arabidopsis Stock Center (Nottingham, England) bezogen wurden, eingesetzt (Tab. 7). Die Samen wurden im Institut für Pharmazeutische Biologie (TU Braunschweig) vermehrt. Homozygote Linien wurden durch Dr. Beena Ravindran (Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig) herangezogen. Die T-DNA-Insertionen wurden durch Kathrin Meier (Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig) nachgewiesen.

Die *A. thaliana* Anzuchterde bestand aus 6,4 l Anzuchterde (Combo GmbH & Co. KG, Wardenburg), 0,8 l Spielsand (Baumarkt), 0,8 l Perligran G (Knauf Perlite GmbH, Bülstringen), 4 g (10 g/10 l) Sierrableu® Stickstoffdünger (The Scotts Miracle-Gro Company, Marysville, USA) sowie 8 g (20 g/10 l) Triabon® Depot-Volldünger (Combo GmbH & Co. KG, Wardenburg). Die Erde wurde für 120 min bei 100°C behandelt. Vor der Aussaat wurde die Erde eines Topfes mit 5-10 ml einer wässrigen Neudomück®-Lösung (2 ml Neudomück® (W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal) pro Liter Leitungswasser) getränkt. Nach der Aussaat wurden die Töpfe mit einer Gewächshaube abgedeckt und für drei Tage bei 4°C gelagert. Die Töpfe wurden in die Kurztagkammer mit den Bedingungen 10 h Licht/ 14 h Dunkelheit, 22°C, 60-70 % relative Luftfeuchtigkeit und Lichtintensität  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  gestellt. Die Pflanzen blieben zehn Tage lang abgedeckt, danach wurde die Gewächshaube entfernt und die Pflanzen wurden alle zwei bis drei Tage mit Leitungswasser gegossen. Die Ernte der Keimlinge erfolgte im Zweiblattstadium. Die Keimlinge brauchten vom Tag der Aussaat dreizehn bis fünfzehn Tage, um das Zweiblattstadium zu erreichen.

**Tabelle 7: Verwendete T-DNA-Mutanten von *A. thaliana*.**

Mutante	Gen	Genlocus	Mutationstyp	SALK-Linie	erzeugt aus
<i>nsp1-1</i>	<i>AtNSP1</i>	At3g16400	T-DNA Insertion	SALK_072600	N572600
<i>nsp2-1</i>	<i>AtNSP2</i>	At2g33070	T-DNA Insertion	SALK_004170-3	N504170
<i>nsp2-2</i>	<i>AtNSP2</i>	At2g33070	T-DNA Insertion	SALK_057194-1	N557194
<i>nsp3-2</i>	<i>AtNSP3</i>	At3g16390	T-DNA Insertion	SALK_016880-4	N516880
<i>nsp4-1</i>	<i>AtNSP4</i>	At3g16410	T-DNA Insertion	SAIL_904_E01	N879821
<i>nsp5-1</i>	<i>AtNSP5</i>	At5g48180	T-DNA Insertion	SALK_121606-1	N621606

Dienten die Pflanzen zur Samengewinnung, wurden sie drei bis vier Wochen nach der Aussaat vereinzelt und bis zur Samenreife in die Langtagkammer mit den Bedingungen 16 h Licht/ 8 h Dunkelheit, 22°C, 60-70 % relative Luftfeuchtigkeit und Lichtintensität  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  gestellt. Nach acht bis zehn Wochen wurden die Pflanzen in Tüten verpackt und weitere zwei Wochen in der Kammer gelagert, bis die Stängel vertrocknet waren. Die getrockneten Pflanzen wurden eine weitere Woche bei Raumtemperatur (RT) auf der Fensterbank gelagert, um den Samen Restfeuchte zu entziehen. Für die Charge 1 wurde für den Wildtyp und die verwendeten T-DNA-Mutanten ein Samenpool aus zehn Pflanzen geerntet. Für die Charge 2 wurden acht Pflanzen gepoolt, für die Charge 3 sechs Pflanzen, mit Ausnahme von *nsp1-1*, hier wurden nur vier Pflanzen gepoolt. Für die Charge 4 wurden für Col-0, *nsp4-1* und *nsp5-1* ein Pool aus acht Pflanzen geerntet, für alle anderen ein Pool aus vier Pflanzen.



### **2.4.2. *Nicotiana benthamiana***

*N. benthamiana* wurde im Institut für Pflanzenbiologie (TU Braunschweig) in der AG Hänsch angezogen. Die Pflanzen wuchsen in Gewächshäusern bei 20-25°C mit zusätzlichem Assimilationslicht von 12 h von 8:00 bis 20:00 Uhr. Die Luftfeuchtigkeit wurde nicht reguliert. Für Messungen wurden Pflanzen verwendet, die zwischen acht und sechzehn Wochen alt waren. *N. benthamiana* wurde auf gedämpfter Erde ausgesät und zwei Wochen nach der Keimung vereinzelt. Die Anzuchterde von *N. benthamiana* bestand aus 20 l gedämpfter Blumenerde (Baumarkt), 140 g Fermacell® Wärmedämmschüttung (Fermacell Werke GmbH, Seesen) und 50 g Blaudünger (gpi green partners international GmbH & Co.KG, Gladbeck).

### 3. Methoden

#### 3.1. Statistik

Für statistische Analysen wurde das Programm OriginPro 2016 (OriginLab Corporation) verwendet. Alle Daten wurden auf Normalverteilung und gleiche Varianz getestet. Normalverteilte Proben wurden mit dem zwei-Stichproben t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft, nicht-normalverteilte Proben mit dem Mann-Whitney-Test.

#### 3.2. Bestimmung des Glucosinolatgehalts

##### 3.2.1. Gewinnung der Desulfoglucosinolate

Frisch geerntete Keimlinge wurden mit Flüssigstickstoff (Linde AG, München) übergossen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Durch Lyophilisieren über vier Tage wurde den Keimlingen das Restwasser entzogen. 20-30 mg lyophilisierte Keimlinge oder 20 mg Samen wurden in Kryoröhrchen eingewogen und mit 400-500 µl Methanol (MeOH) versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 50 µl des 1 mM internen Standards *p*OHB-Glucosinolat und 400-500 µl Wasser versetzt. Zu den Proben wurden drei Metallkügelchen oder Glaskügelchen und eine Spatelspitze Seesand gegeben.

Zur Bestimmung der intakten Glucosinolate im wässrigen Homogenat wurden 20 mg Samen oder 200 mg frisch geerntete Keimlinge eingewogen. Die Samen wurden in einem Mörser nach Zugabe einer Spatelspitze Seesand homogenisiert, mit 200 µl 50 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)-Puffer pH 6 versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Die Keimlinge wurden in Kryoröhrchen eingewogen, mit einer Spatelspitze Seesand versetzt und mit einem Mikropistill zerkleinert. Die zerkleinerten Keimlinge wurden ebenfalls mit 200 µl 50 mM MES-Puffer pH 6 versetzt. Die Proben wurden 10-15 min bei RT stehen gelassen und anschließend mit 400 µl MeOH versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 50 µl des 1 mM internen Standards *p*OHB-Glucosinolat und 200 µl Wasser versetzt. Zu den Proben wurden drei Metallkügelchen und eine Spatelspitze Seesand gegeben.

Alle Proben wurden 90 s mit dem Paintshaker aufgearbeitet, für 4 min in das Ultraschallbad gestellt und für weitere 4 min bei 13.400 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden erneut mit 400-500 µl Wasser versetzt und die Probenaufarbeitung ab dem Paintshaker wurde wiederholt.

In Polyprep-Leersäulen (BioRad Laboratories, Kalifornien, USA) wurde 250 µl Diethylaminoethyl (DEAE)-Sephadex-Suspension pipettiert. Die DEAE-Sephadex-Suspension bestand aus 0,1 g/ml DEAE-Sephadex A25 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Die Säulen wurden mit 5 ml Wasser und 1 ml 80 % (vol/vol) MeOH gewaschen. Die Extrakte wurden auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden zweimal mit 1 ml 80 % (vol/vol) MeOH, mit 1 ml Wasser und mit 1 ml 0,02 M Acetatpuffer pH 5 gespült. Auf jede Säule wurde 60 µl Sulfatase (28 mg *Helix pomatia* Sulfatase Typ H1 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) in 1 ml 0,02 M Acetatpuffer pH 5) gegeben und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag

wurden die Proben zweimal mit 750 µl 60 % (vol/vol) MeOH eluiert und unter Luft bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 200-400 µl Wasser aufgenommen.

### 3.2.2. Analyse der Desulfoglucosinolate mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Probenmessung erfolgte mit dem HPLC-Gerät HP 1200 (Tab. A9). Als Säule wurde eine C18 *reverse-phase* (RP)-Säule (LiChrospher 100 RP18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm Partikelgröße; Wicom GmbH, Heppenheim) verwendet. Die mobile Phase bestand bei Messbeginn aus 98,5 % (vol/vol) Wasser (Fließmittel A) und 1,5 % (vol/vol) Acetonitril (Fließmittel B). Die Flussrate wurde auf 1 ml/min bei 25°C eingestellt, das Druckmaximum auf 400 bar. 25 µl der in 3.2.1. hergestellten Probenlösung wurde injiziert. Der Gradient war wie folgt: 1,5 % (vol/vol) B (1 min), 1,5-5 % (vol/vol) B (5 min), 5-7 % (vol/vol) B (2 min), 7-21 % (vol/vol) B (10 min), 21-29 % (vol/vol) B (5 min), 29-43 % (vol/vol) B (7 min), 43-93 % (vol/vol) B (5 min), 93 % (vol/vol) B (5 min), 93-1,5 % (vol/vol) B (5 min) und 1,5 % (vol/vol) B (5 min). Mit dem Diodenarray-Detektor wurden die Desulfoglucosinolate in 2 nm Intervallen im Bereich von 190-360 nm detektiert.

Identifiziert wurden die Desulfoglucosinolate über Retentionszeiten und UV-Spektren im Vergleich zu Standardverbindungen. Quantifiziert wurden sie über Peakflächen bei 229 nm im Vergleich zum internen Standard *p*OHB-Glucosinolat unter Verwendung der Responsefaktoren (RF) RF = 2,0 für aliphatische Glucosinolate, RF = 0,7 für 3BZO- und 4BZO-Glucosinolat und RF = 0,5 für Indol-Glucosinolate [Brown et al., 2003; Burow et al., 2006]. Die Stoffmenge wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{nmol (Analyt)} = \frac{\text{Fläche (Analyt)} \times \text{RF} \times \text{nmol (Interner Standard)}}{\text{Fläche (Interner Standard)}}$$

### 3.3. Bestimmung der Glucosinolat-Abbauprodukte

#### 3.3.1. Homogenatherstellung

30-40 mg Samen wurden eingewogen und nach Zugabe einer Spatelspitze Seesand im Mörser zerrieben. 300-400 mg Keimlinge wurden in Kryoröhrchen eingewogen, mit einer Spatelspitze Seesand versetzt und mit einem Mikropistill zerrieben. Alle Proben wurden mit 300-400 µl 50 mM MES-Puffer pH 6 versetzt und homogenisiert. Das Homogenat der Samen wurde in Kryoröhrchen überführt. Alle Proben wurden 5-10 min bei RT stehen gelassen und anschließend mit 30-60 µl des internen Standards Phenylcyanid (1:10.000 (vol/vol) in MeOH) versetzt. Die Proben wurden 90 s im Paintshaker geschüttelt und bei 13000 rpm und RT 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 5 ml Glasvials überführt und zweimal mit 750-1500 µl Dichlormethan ausgeschüttelt. Die untere Phase wurde mit Glas-Pasteurpipetten abgenommen, über mit Glaswolle und wasserfreiem Natriumsulfat gefüllte Säulen getrocknet, unter Stickstoff auf 100-150 µl eingengt und gaschromatographisch analysiert.

### 3.3.2. Analyse der Glucosinolat-Abbauprodukte mittels Gaschromatographie (GC)

Die Auftrennung der Abbauprodukte erfolgte über den Gaschromatograph 6890 N (Tab. A9) [Lambrix et al., 2001]. Die Identifizierung erfolgte durch Massenspektrometrie (MS), die Quantifizierung nach Flammenionisationsdetektion (FID). Verwendet wurde eine HP5MS-Säule (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm Partikelgröße; Wicom, Heppenheim) oder eine ZB5MS-Säule (30 m x 0,25 mm; 0,50 µm Partikelgröße; Phenomex, Aschaffenburg). Die Injektion der Proben erfolgte im splitless-Modus. 1 µl der Probe wurde eingespritzt. Die Anfangstemperatur lag bei 200°C. Folgendes Temperaturprogramm wurde für die GC-MS und GC-FID verwendet: 35°C für 3 min, 12°C/min bis 280°C, 30°C/min bis 300°C (GC-MS) oder bis 310°C (GC-FID). Für die MS wurden folgende Parameter gewählt: Ionisationsenergie auf 70 eV, Temperatur der Ionenquelle auf 230°C, Temperatur der Transferlinie auf 280°C und Massenscan auf 41-500 Da. Als Trägergas wurde für beide Methoden Helium eingesetzt.

Die Abbauprodukte wurden über Retentionszeiten sowie Massenspektren bekannter Standards oder publizierte Massenspektren [Spencer und Daxenbichler, 1980] identifiziert. In der GC-FID wurde die Identifizierung über die Retentionszeiten im Vergleich zu den Retentionszeiten der GC-MS durchgeführt, die Quantifizierung erfolgte über die Peakflächen im Vergleich zum internen Standard Phenylcyanid unter Einbeziehung von Responsefaktoren (Tab. 8). Berechnet wurden die Responsefaktoren aus der Effective Carbon Number [Scanlon und Willis, 1985]. Die Stoffmenge wurde mit der in 3.2.2. dargestellten Formel berechnet.

**Tabelle 8: Responsefaktoren relativ zu Phenylcyanid zur Quantifizierung der Glucosinolat-Abbauprodukte.**

Glucosinolat-Abbauprodukte	Responsefaktoren
4MSOB-CN	1,19
4MSOB-NCS	1,05
4OHB-NCS	1,40
4MTB-CN	1,19
4MTB-NCS	1,05
5MTP-CN	1,00
5MTP-NCS	0,90
7MTH-CN	0,76
7MTH-NCS	0,70
8MTO-CN	0,68
8MTO-NCS	0,63
3BZO-CN	0,72
3BZO-NCS	0,66
4BZO-CN	0,64
4BZO-NCS	0,60
Phenylacetonitril	0,86
Benzyl-NCS	0,79
I3M-CN	0,68

### 3.4. Expressionsanalyse

#### 3.4.1. Isolierung und Evaluierung von RNA

Die RNA-Isolierung wurde in abgewandelter Form nach dem Protokoll von Raha et al., 1990 durchgeführt. Für die RNA-Isolierung wurden rund 200 mg Keimlinge in Stickstoff gemörsert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden mit 550 µl RNA-Extraktionspuffer versetzt, mit einem Mikropistill gemischt und 5 min mit offenem Deckel auf Eis gelagert. 550 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (IAA) (25:24:1 vol/vol/vol) wurde zu den Proben hinzugegeben. Die Proben wurden 15 s gevortext und 3 min bei 21.912 x g und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 550 µl Chloroform: IAA (Acros Organics) (24:1 vol/vol) versetzt, 15 s gevortext und 3 min bei 21.912 x g und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl 10 M Lithiumchlorid versetzt und vorsichtig invertiert. Die Proben inkubierten 60 min auf Eis und wurden 20 min bei 20.347 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet durch mehrmaliges Vortexen in 100 µl Wasser gelöst. Die Proben inkubierten für 15 min auf Eis und wurden anschließend mit einer Mischung aus 250 µl absolutem Ethanol und 10 µl 3M Natriumacetat versetzt. Die Proben inkubierten 60 min bei -80°C und wurden anschließend 30 min bei 21.912 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet mit kaltem 75 % (vol/vol) Ethanol gewaschen. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und der Überstand wurde vollständig abgenommen. Das Pellet wurde 30 min luftgetrocknet, durch mehrmaliges Vortexen in 40 µl Wasser gelöst und 30 min auf Eis gestellt. Während der Inkubation wurden die Proben regelmäßig gevortext.

Ein Aliquot (0,2-1,5 µl) der RNA wurde mit 3 µl 6 x DNA Loading Dye Buffer und 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor versetzt, auf 1 % (m/vol) Agarose-Gele (siehe 3.5.6.) aufgetragen. Von dem Marker Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) wurden 6 µl aufgetragen. Das Gel lief 20 min bei 120 Volt. Die Gelbanden wurden unter dem Transilluminator bei 365 nm betrachtet. Wiesen sie uneinheitliche Intensitäten auf, wurde für ein neues Gel die Menge der RNA so angepasst, dass alle Gelbanden ähnliche Intensitäten aufwiesen. Die Menge der RNA wurde mithilfe des Markers und der rRNA-Hauptbanden unter Verwendung des Programms ImageJ 1.48 (National Institut of Health) anhand der Pixelzahl abgeschätzt. Die RNA-Gesamtmenge wurde zunächst photometrisch bestimmt. Die photometrische Bestimmung wurde durch einen roten Farbstoff, der bei der Aufarbeitung der Keimlinge mitisoliert wurde, gestört, sodass auf die Intensitäten der Gelbanden zurückgegriffen wurde.

RNA-Extraktionspuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 8
	0,4 M Lithiumchlorid
	25 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
	1 % (m/vol) Natriumdodecylsulfat (SDS)

#### 3.4.2. RT-PCR

Um störende genomische DNA auszuschalten, wurden die Proben aus 3.4.1. mit DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) versetzt. Das Beseitigen genomischer DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Die cDNA-Synthese wurde nach dem der RevertAid H Minus Reverse Transcriptase beiliegenden Hersteller-Protokoll durchgeführt. Rund 0,25 µg RNA wurden für die cDNA-Synthese eingesetzt.

Für die PCR enthielt jeder Ansatz 0,5-4 µl cDNA (Tab. 9), 2,5 µl 10 x Dream Taq™ Buffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,25 µl Dream Taq™ DNA-Polymerase sowie 2 µl der entsprechenden Primer (Tab. A1). Die Proben wurden mit Wasser ad 25 µl aufgefüllt. Die cDNA wurde verdünnt und verschiedene Volumina wurden eingesetzt (Tab. 9). Das Temperaturprogramm ist Tabelle 9 und 10 zu entnehmen. 2 µl der PCR-Produkte wurde mit 4 µl 6 x Ladepuffer versetzt und mit Wasser ad 12 µl aufgefüllt. Die Proben wurden gelelektrophoretisch getrennt (siehe 3.5.6.).

**Tabelle 9: Eingesetzte cDNA-Mengen und Bedingungen der durchgeführten semiquantitativen RT-PCR.**

Transkript	cDNA-Menge	Annealing-Temperatur in °C	Zyklen
<i>Aktin8</i>	1 µl einer 1:20 Verdünnung	63	30 x
<i>AtNSP1</i>	2 µl einer 1:20 Verdünnung	63	34 x
<i>AtNSP2</i>	1 µl einer 1:20 Verdünnung	65	30 x
<i>AtNSP3</i>	4 µl einer 1:4 Verdünnung	65	34 x
<i>AtNSP4</i>	0,5 µl einer 1:20 Verdünnung	63	34 x
<i>AtNSP5</i>	1 µl unverdünnt	65	30 x

**Tabelle 10: Temperaturprogramm für die Expressionsanalyse von *AtNSP1-AtNSP5* in Keimlingen von *A. thaliana*.**

Phase	Temperatur in °C	Zeit in min
Vorheizen des Deckels	99	-
Initiale Denaturierung	94	2
Denaturierung	94	0,5
Annealing	63-65	1
Elongation	72	1
Finale Elongation	72	10
Reaktionsstopp	16	∞

} 30-34 Zyklen

6 x Ladepuffer

0,025 % (m/vol) Xylencyanol  
0,025 % (m/vol) Bromphenolblau  
25 % (m/vol) Ficoll 400  
50 mM EDTA

### 3.4.3. Klonierung von Produkten der RT-PCR

Die Produkte repräsentativer Proben der nach 3.4.2. durchgeführten PCR wurden in pGEM®-T Easy Vektoren unter Verwendung des pGEM®-T Easy Vector System Kit (Promega, Wisconsin, USA) nach Hersteller-Protokoll kloniert und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde isoliert (siehe 3.5.8.) und sequenziert (siehe 3.5.11.).

### 3.5. Standardmethoden der Molekularbiologie

#### 3.5.1. Kryokulturen

Für Entry- und Expressionsvektoren wurden Kryokulturen angelegt. Hierbei wurden 750-800 µl der Bakterienkultur mit sterilem Glycerin, LB-Glycerin- oder YEB-Glycerin-Medium ad 1000 µl versetzt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C im Institut für Pflanzenbiologie (AG Hänsch) oder im Institut für Pharmazeutische Biologie (AG Wittstock) gelagert.

LB-Glycerin-Medium <i>lysogeny broth</i>	1 % (m/vol) Pepton aus Casein 0,5 % (m/vol) Hefeextrakt 1 % (m/vol) NaCl pH-Wert 7.5 60 % (m/vol) Glycerin
YEB-Glycerin-Medium	1 % (m/vol) Bactopepton 1 % (m/vol) Hefeextrakt 0,5 % (m/vol) NaCl 60 % (m/vol) Glycerin

#### 3.5.2. Herstellung kompetenter Zellen

##### 3.5.2.1. Chemisch kompetente *E. coli* XL1blue Zellen

5 ml LB-Flüssigmedium wurden mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Eine 50 ml Hauptkultur wurde mit 500-700 µl der Übernachtskultur angeimpft und für 2-3 h bei 220 rpm inkubiert bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,4-0,5 erreicht war. Die Kulturen wurden für 10 min auf Eis gestellt und für weitere 10 min bei 4°C und 2568 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  vorsichtig resuspendiert. Die Kulturen wurden 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 5 min bei 4°C und 2568 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  mit 15 % (vol/vol) Glycerin langsam resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden über Nacht bei 4°C gelagert, nach 12-24 h in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

##### 3.5.2.2. Chemisch kompetente *E. coli* DH5α Zellen

Die Übernachtskultur wurde, wie in 3.5.2.1. beschrieben, angefertigt. Eine 50 ml Hauptkultur wurde mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 220 rpm 2-4 h inkubiert bis die  $OD_{580}$  von 0,5-0,8 erreicht war. Die Kulturen wurden 10 min bei 2568 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem 50 mM  $CaCl_2$  vorsichtig resuspendiert, für 10 min bei 2568 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 20 ml eiskaltem 50 mM  $CaCl_2$  vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 2568 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem 50 mM  $CaCl_2$

resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. 960 µl der Zellsuspension wurde mit 140 µl 87 % (vol/vol) eiskaltem Glycerin vorsichtig gemischt. Die kompetenten Zellen wurden in 50 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.5.2.3. Elektrokompetente Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH5α und *R. radiobacter* Zellen wurde 3 ml des entsprechenden Mediums mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C (*E. coli*) oder 28°C (*R. radiobacter*) und 200-220 rpm inkubiert. Eine 400 ml Hauptkultur wurde mit 800 µl der Vorkultur angeimpft und für 4 h (*E. coli*) oder 16 h (*R. radiobacter*) bei der entsprechenden Temperatur und 200-220 rpm inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht war. Die Kulturen wurden auf Eis gestellt und anschließend für 20 min bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 x 25 ml oder in 1 x 250 ml eiskaltem 10 % (vol/vol) Glycerin vorsichtig resuspendiert und 20 min bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem 10 % (vol/vol) Glycerin resuspendiert und für 20 min bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem 10 % (vol/vol) Glycerin vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl eiskaltem 10 % (vol/vol) Glycerin resuspendiert und in 40 µl Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.5.3. Transformation von kompetenten Zellen

#### 3.5.3.1. Transformation von *E. coli*

Für Transformationen von kompetenten Zellen wurden 1-2 µl der Ansätze zu 50 µl chemisch kompetenten oder elektrokompetenten *E. coli* Zellen pipettiert. Wurden chemisch kompetente Zellen verwendet, wurden die Proben 30 min auf Eis gelagert. Die Proben wurden für 35-45 s im Wasserbad bei 42°C hitzegeschockt, kurz auf Eis gestellt und mit 250 µl SOC-Medium versetzt.

Bei Verwendung elektrokompetenter Zellen wurden die Proben für 3 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Dicke von 2 mm überführt und mit dem Gene Pulser Xcell™ bei 3000 V, 25 µF und 400 Ω für 10 ms elektroporiert. 1 ml vorgewärmtes LB Low Salt- oder LB-Medium wurde zu den Zellen gegeben.

Alle Proben wurden für 1 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. 20 µl, 100 µl oder 1 ml der transformierten BP-Proben wurde auf Low Salt LB-Platten mit Zeocin (50 µg/ml) (Invitrogen) ausplattiert. 1 ml der transformierten LR-Proben wurde auf LB-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml) (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe; Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) oder Spectinomycin (50 µg/ml) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) ausplattiert. Für alle anderen Ansätze wurden 50-100 µl auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C. 3-10 ml Low Salt LB- oder LB-Flüssigmedium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, wurde mit einer Kolonie inokuliert. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert.



## Methoden

SOC-Medium  
*super optimal broth with  
catabolite repression*

2 % (m/V) Pepton aus Casein  
0,5 % (m/V) Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
pH-Wert 7.5

10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,4 % (vol/vol) Glucose werden nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben.

LB-Medium

1 % (m/vol) Pepton aus Casein  
0,5 % (m/vol) Hefeextrakt  
1 % (m/vol) NaCl  
pH-Wert 7.5

Das Festmedium wird vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (m/vol) Agar versetzt.

Low Salt LB-Medium

1 % (m/vol) Pepton aus Casein  
0,5 % (m/vol) Hefeextrakt  
0,5 % (m/vol) NaCl  
pH-Wert 7.5

Das Festmedium wird vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (m/vol) Agar versetzt.

### 3.5.3.2. Transformation von *Rhizobium radiobacter*

0,5-1,5 µl der Plasmid-Präparation wurde zu 50 µl elektrokompenter *R. radiobacter* C58C1 Zellen pipettiert und in eine vorgekühlte 1-2 mm dicke Elektroporationsküvette überführt. Für die Elektroporation wurde der Gene Pulser Xcell™ (siehe 3.5.3.1.) oder der MicroPulser™ mit den Einstellungen 2,2 kV und ein Puls für 6 ms verwendet. Die Proben wurden sofort mit 1 ml vorgewärmten YMB- oder CPY-Flüssigmedium gemischt und für 1 h bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Alternativ wurden die elektroporierten Proben in sterile Falconröhrchen, die 9 ml YMB- oder CPY-Flüssigmedium enthielten, überführt und für 3 h bei 28°C und 220 rpm inkubiert. 100 µl einer 1:10 Verdünnung oder 1 ml einer 1:1000 Verdünnung wurden auf YMA- oder CPY-Platten ausgestrichen. Die Platten enthielten Rifampicin (50-100 µg/ml) (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe; Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), Gentamycin (20 µg/ml) (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe; Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) und Kanamycin (50 µg/ml) oder Rifampicin, Gentamycin und Spectinomycin (50 µg/ml). Die Platten inkubierten drei bis vier Tage bei 28°C. 5 ml YMB- oder CPY-Flüssigmedium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, wurde mit einer Kolonie inokuliert. Die Flüssigkulturen wurden ein bis zwei Tage bei 28°C und 220 rpm inkubiert.

Der Erfolg der Transformation von *R. radiobacter* wurde mittels Kontroll-PCR der Gesamt-DNA oder durch Transformation von *E. coli* mit der aus *R. radiobacter* isolierten DNA (siehe 3.5.9.) und anschließender Plasmidisolierung und Verdau (siehe 3.5.8. und 3.5.4.) überprüft. Für die Kontroll-PCR wurde 150 ng *R. radiobacter*-Gesamt-DNA mit 2,5 µl 10 x Dream Taq™ Buffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,4 µl Dream Taq™ DNA-Polymerase und 1 µl der jeweiligen Primer (Tab. A5) mit Wasser ad 25 µl gemischt. Das Temperaturprogramm ist Tabelle 11 zu entnehmen. 5 µl PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch getrennt (siehe 3.5.6.), mittels

Gelextraktion aufgereinigt (siehe 3.5.7.) und sequenziert (siehe 3.5.11.). Die zur Sequenzierung mitgeschickten Primer sind im Anhang aufgelistet (Tab. A6).

**Tabelle 11: Temperaturprogramm der Kontroll-PCR.**

Phase	Temperatur in °C	Zeit in min
<b>Vorheizen des Deckels</b>	99	-
<b>Initiale Denaturierung</b>	95	3
<b>Denaturierung</b>	95	0,45
<b>Annealing</b>	62,5-63	1
<b>Elongation</b>	72	2
<b>Finale Elongation</b>	72	10
<b>Reaktionsstopp</b>	16	5

} 35 Zyklen

YMB-Medium	0,04 % (m/vol) Hefeextrakt 0,05 % (m/vol) K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,02 % (m/vol) MgSO <sub>4</sub> 1 % (m/vol) Mannitol pH-Wert 7.0
------------	--

Das YMA-Festmedium wird vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (m/vol) Agar versetzt.

CPY-Medium	0,5 % (m/vol) Pepton aus Casein 0,5 % (m/vol) Saccharose 1 % (m/vol) Hefeextrakt 0,0493 % (m/vol) MgSO <sub>4</sub> pH-Wert 5,8-6.0
------------	---

Das Festmedium wird vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (m/vol) Agar versetzt.

### 3.5.4. Restriktionsverdau

Für den Verdau wurden 500-1000 ng Plasmid-DNA, 1 µl 10 x Puffer und jeweils 0,3 µl Restriktionsenzym eingesetzt und mit Wasser ad 10 µl aufgefüllt. Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet: Fast-Digest® BamHI, Fast-Digest® XbaI, Fast-Digest® EcoRI, Fast-Digest® BamHI, Fast-Digest® PvuII, Fast-Digest® XbaI, Fast-Digest® XhoI, EcoRI sowie PvuII. Die Proben wurden 1h bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch getrennt (siehe 3.5.6.). Für die Auswertung des Verdaus wurde die Fragmentgröße mit dem laut Webcutter 2.0 (Max Heimann, 1997) erwarteten Fragmentgröße verglichen.

### 3.5.5. Gateway-Klonierung

#### 3.5.5.1. PCR zur Erzeugung von *attB*-Produkten

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interaktions- und Lokalisationsstudien mussten verschiedene Expressionsvektoren angefertigt werden. Die Expressionsvektoren

wurde mit dem Gateway-Klonierungssystem der Firma Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) hergestellt. Dafür wurde zunächst ein PCR-Produkt erzeugt, das das Zielgen mit oder ohne Stop-Codon enthielt und von *attB*-Sites flankiert war.

Die PCR wurde mit der Phusion® High-Fidelity (HF) DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) oder mit der Dream Taq™ DNA-Polymerase durchgeführt. 40-80 ng des jeweiligen Templates wurden eingesetzt (Tab. 12). Die Proben wurden mit 5 µl 5 x Phusion® Reaction Buffer oder 10 x Dream Taq™ Buffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,2-0,3 µl Phusion® HF DNA-Polymerase oder 0,25 µl Dream Taq™ DNA-Polymerase und 0,25-1,25 µl der entsprechenden Primer (Tab. A2, A3) versetzt und mit Wasser ad 25 µl aufgefüllt. Das Temperaturprogramm ist Tabelle 12 und 13 zu entnehmen.

**Tabelle 12: PCR-Bedingungen zur Herstellung der *attB*-Produkte.**

Template	Primer (Tab. A2, A3)	Annealing-Temperatur in °C	Zyklen
pENTRY_tgg1_ohne stop	P1 + P2/P3	58/60/65	35 x
pET52b(+) <i>modII_MBPV (NSP1)</i>	P4 + P5/P6	58	40 x
pET52b(+) <i>modII_MBPIII (NSP2)</i>	P7 + P8/P9	58	40 x
pET52b(+) <i>modII_MBPVI (NSP4)</i>	P10 + P11/P12	58	40 x
pET52b(+) <i>modII_MBPVI (NSP5)</i>	P13 + P14/P15	58	40 x
pENTRY_tatfp_ohne stop	P16 + P17/P18	58	40 x

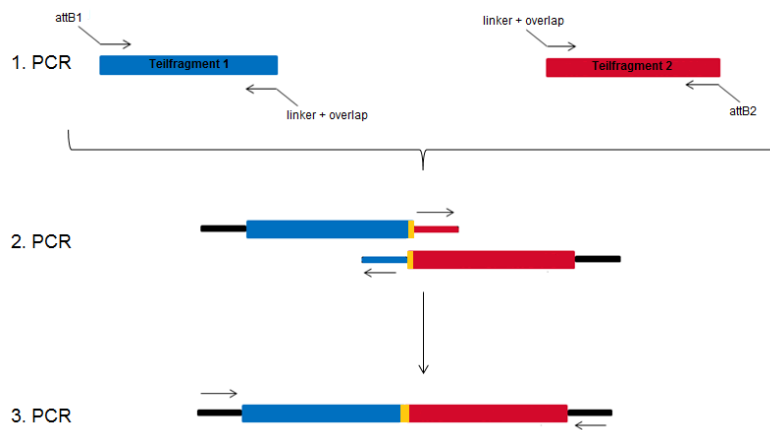
**Tabelle 13: Temperaturprogramm zur Herstellung der *attB*-Produkte.**

Phase	Temperatur in °C	Zeit in min
Initiale Denaturierung	95	5
Denaturierung	95	0,5
Annealing	55-65	1
Elongation	72	1
Finale Elongation	72	10
Ende	15/ 16	∞

} 35-40 Zyklen

Zur Herstellung der split-mCherry-Expressionsvektoren wurde die cDNA der zu untersuchenden Interaktionspartner (TGG1, AtNSP3, Cnx6 und Cnx7) mit der cDNA des N- bzw. C-terminale Fragments von mCherry (mCYN bzw. mCYC) fusioniert. Dazu wurden drei PCR-Reaktionen benötigt. In der ersten PCR wurde an jedem Teilfragment mittels Primer eine *attB*-Site und ein Überlapp (Overlap) zu dem zu fusionierenden Teilfragment erzeugt (Abb. 4). Anschließend wurden die *attB*-Teilfragmente amplifiziert. In der zweiten PCR, der Fusions-PCR, wurden die Doppelstränge nach spontaner Hybridisierung der Overlaps vervollständigt (Abb. 4). In der dritten PCR wurde das Fusionsprodukt unter Zugabe der entsprechenden Primer amplifiziert (Abb. 4).

4-40 ng des jeweiligen Templates (Tab. 14) wurden in der ersten PCR eingesetzt. Als Polymerasen wurde die Phusion® HF DNA-Polymerase oder die Phusion Green HF DNA-Polymerase eingesetzt. Die Ansätze wurden, wie oben und in Tabelle 14 beschrieben, hergestellt. Abweichend von der oben beschriebenen PCR wurden die Reaktionen nach 20 Zyklen erneut mit 0,3 µl Phusion DNA-Polymerase versetzt. Das Temperaturprogramm ist Tabelle 13 und 14 zu entnehmen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Fusions-PCR.** Im ersten Schritt werden an die Teilfragmente *attB*-Sites sowie ein Overlap zu dem zu fusionierenden zweiten Teilfragment angebaut. Danach erfolgt die Amplifizierung der *attB*-Teilfragmente. In der zweiten PCR, der Fusions-PCR, findet das Aneinanderlagern der Teilfragmente statt und das gewünschte Fusionsprodukt entsteht. Dieses wird in der letzten PCR vervielfältigt.

**Tabelle 14: PCR-Bedingungen zur Herstellung der *attB*-Teilfragmente.**

Template	Primer (Tab. A4)	Annealing-Temperatur in °C	Zyklen
<b>pENTRY_tgg1_ohne-stop</b>	P19 + P20	58/60	40 x
<b>pENTRY_atnsp3_ohne-stop</b>	P23 + P24	55/58	35 x
<b>pExp_cluc-cnx7_E6</b>	P28 + P29	56	35 x
<b>pExp_nluc-cnx6</b>	P30 + P31	56	35 x
<b>pENTRY_P2R-P3</b>	P21 + P22/ P25 + P22/ P26 + P27/ P32 + P22	55/58/60	38 x

Nach der ersten PCR wurde 20-25 µl *attB*-Produkt zu 1/5 mit 6 x Ladepuffer oder 6 x DNA-Gel-Ladepuffer versetzt und gelelektrophoretisch getrennt (siehe 3.5.6.). Die Gelbanden wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt (siehe 3.5.7.). In die Fusions-PCR wurden jeweils 2 µl der aufgereinigten Teilfragmente eingesetzt. Die Ansätze wurden, wie oben beschrieben hergestellt, jedoch ohne Zugabe von Primern, und mit Wasser ad 20 µl aufgefüllt. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15: Temperaturprogramm zur Herstellung der fusionierten Produkte sowie zur anschließenden Amplifizierung.**

Phase	Temperatur in °C	Zeit in min
<b>Initiale Denaturierung</b>	95	5
<b>Denaturierung</b>	95	1
<b>Annealing</b>	55/58/60	1,5
<b>Elongation</b>	72	1,5
<b>Finale Elongation</b>	72	10
<b>Ende</b>	15/ 16	∞

7-10 Zyklen

Für die dritte PCR wurden 5-10 µl der in der Fusions-PCR entstandenen Templates in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jede Probe wurde mit 3-4 µl 10 mM dNTPs, 3-5 µl 5 x Phusion Buffer, 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase sowie 0,5 µl der entsprechenden Primer versetzt (Tab. 16). Das Temperaturprogramm ist Tabelle 15 zu entnehmen.

**Tabelle 16: Bedingungen zur Amplifizierung der *attB*-Fusionsprodukte.**

PCR-Produkt	Primer (Tab. A4)	Zyklen
<b><i>attB1_tgg1-mcyc_attB2</i></b>	P19 + P22	45 x
<b><i>attB1_atnsp3-mcyn_attB2</i></b>	P23 + P22	45 x
<b><i>attB1_mcyc-cnx7_attB2</i></b>	P27 + P29	40 x
<b><i>attB1_cnx6-mcyn_attB2</i></b>	P30 + P22	40 x

20-25 µl *attB*-Fusionsprodukt wurde zu 1/5 mit 6 x Ladepuffer oder 6 x DNA-Gel-Ladepuffer versetzt und gelelektrophoretisch getrennt (siehe 3.5.6.). Die Gelbanden wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt (siehe 3.5.7.).

6 x DNA-Gel-Ladepuffer

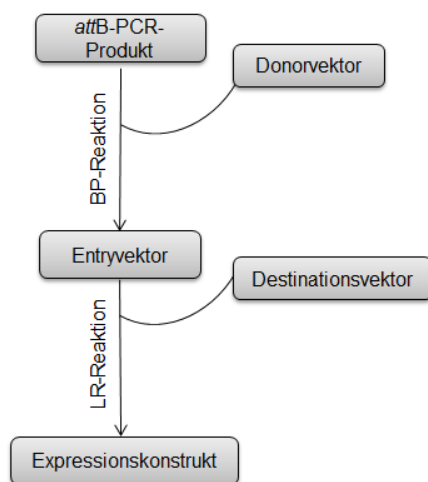
0,25 % (m/vol) Bromphenolblau

0,25 % (m/vol) Xylencyanoblauf

30 % (vol/vol) Glycerol

### 3.5.5.2. BP- und LR-Reaktion

Die Gateway-Klonierung beruht auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ . Hierbei können Sequenzen, die von sogenannten *attachement*-Sites (*att*-Sites) flankiert sind, durch homologe Rekombination gegeneinander ausgetauscht werden. Das *attB*-PCR-Produkt wird in der BP-Reaktion mittels BP-Clonase in den *attP*-Sites-tragenden Donorvektor kloniert, es entsteht ein Entryvektor mit *attL*-Sites (Abb. 5). In der nachfolgenden LR-Reaktion wird das Zielgen aus dem Entryvektor mittels LR-Clonase in einen *attR*-Sites-tragenden Destinationsvektor kloniert, sodass der Expressionsvektor entsteht (Abb. 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gateway-Klonierung.** Das mit *attB*-Sites flankierte Zielgen wird mittels PCR erzeugt und in der BP-Reaktion, einer Rekombinationsreaktion, über die BP-Clonase in einen Donorvektor kloniert. Ein Entryvektor, der das Zielgen trägt, entsteht. In der LR-Reaktion, einer weiteren Rekombinationsreaktion, wird das Zielgen aus dem Entryvektor in einen Destinationsvektor kloniert. Ein Expressionsvektor mit dem gewünschten Zielgen entsteht.

Für BP-Reaktionen wurde der Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) verwendet. Die BP-Reaktionen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt oder der Ansatz bestand aus 1 µl des aufgereinigten *attB*-Fusionsprodukts, 1 µl pDONR/Zeo, 2 µl Tris-EDTA (TE)-Puffer pH 8 und 1 µl BP-Clonase. Abweichend zum Protokoll wurden einige Reaktionsansätze über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Ansätze mit 0,75-1 µl Proteinase K abgestoppt. Die hergestellten und verwendeten Donor- sowie Entryvektoren sind in Tabelle 3 dargestellt (siehe 2.2.).

LR-Reaktionen wurden mit dem Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix oder dem Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) durchgeführt. Für den Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix wurde abweichend zum Hersteller-Protokoll 300 ng Destinationsvektor und 400 ng Entryvektor eingesetzt. Ansonsten wurde 1 µl des Entryvektors mit 0,5-1 µl des Destinationsvektors sowie 1 µl LR-Clonase versetzt und mit TE-Puffer pH 8 ad 5 µl aufgefüllt. Alle Proben wurden 2-3 h bei 25°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0,75-1 µl Proteinase K abgestoppt. Die verwendeten Entry- und Destinationsvektoren sind in Tabelle 3 und 4 aufgelistet (siehe 2.2.).

TE-Puffer, pH 8.0	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH-Wert 8.0
-------------------	--

### 3.5.6. Gelelektrophorese

Für gelelektrophoretische Trennungen wurden 1-2 % (g/vol) Agarosegele verwendet. Agarose-Gele wurden mit 1 x Tris-Borsäure-EDTA (TBE)- oder 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer angesetzt. Die Agarose-Puffer-Lösung wurde in einer Mikrowelle bei 700 W für 2-3 min aufgekocht. Die handwarme Gellösung wurde mit 1-3,5 µl Midori-Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) oder 0,05 % (vol/vol) Roti®-Safe Gel Stain versetzt und ausgegossen. Die Gele liefen 30-50 min bei 80-120 V (V konst.). Als Marker dienten der 100 bp DNA Ladder, 1kb DNA plus Ladder oder der 1kb DNA Ladder (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Die Gele wurden mit dem Transilluminator bei 365 nm und der Software InfinityCapt (für Windows, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell) ausgewertet oder mit der Chemidoc™ XRS<sup>+</sup> Molecular Imager® betrachtet und dem Programm ImageLab™ 5.2 (BioRad Laboratories, Kalifornien, USA) dokumentiert.

1 x TBE-Puffer	89 mM Tris Pufferan® 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 20 mM Natriumacetat pH-Wert 8.2

### 3.5.7. Agarose-Gel-Extraktion

Für Agarose-Gel-Extraktionen wurden DNA-Banden nach gelelektrophoretischer Trennung unter dem UV-Transilluminator betrachtet. Die Gelbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und ausgewogen. Die Agarose-Gel-Extraktion wurde mit dem QIAEX® II Gel Extraction Kit (150) (QIAGEN, Hilden) oder dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 3.5.8. Isolierung der Plasmid-DNA

2 ml Kulturen wurden für 5 min bei 2795 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 wurden die Proben durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT stehen gelassen. Die Proben wurden mit 300 µl Puffer 3 versetzt, durch Invertieren gemischt, 20 min auf Eis gestellt und für 10 min bei 21.912 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Volumenteil (VT) Chloroform gemischt und für 10 min bei 21.912 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß

überführt, mit 0,7 VT Isopropanol gemischt und für 20 min bei 21.912 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70 % (vol/vol) Ethanol gewaschen und für 5 min bei 21.912 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde rund 30 min an der Luft getrocknet, in 40 µl 10 mM Tris pH 8.5 resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas/ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) oder dem NucleoSpin® Plasmid Easy Pure (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren) unter Verwendung des Hersteller-Protokolls isoliert.

Puffer 1	50 mM Tris 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O 100 µg/µl RNase A pH-Wert 8.0
Puffer 2	200 mM NaOH 1% (m/vol) SDS-Lösung
Puffer 3	3 M Kaliumacetat pH-Wert 5.5 (mit Eisessig)

### 3.5.9. Isolierung der Gesamt-DNA aus *R. radiobacter*

2 ml *R. radiobacter*-Kulturen wurden bei 3634 x g und RT für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in 500 µl 100 mM Tris pH 8 resuspendiert und jeweils bei 3634 x g und RT für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl DNA-Extraktionspuffer für *R. radiobacter* resuspendiert. Die Proben wurden mit 12,5 µl einer 20 mg/ml Proteinase-K-Stammlösung (900 U/ml) (Fermentas/ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) versetzt und gevortext. Nach Zugabe von 160 µl 10 % (vol/vol) SDS wurden die Proben durch Invertieren gemischt und für 1 h bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 500 µl zimmerwarmen Phenol/Chloroform (1:1 vol/vol) gemischt. Die Proben wurden 20 min bei RT und 21.912 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 360 µl Isopropanol gemischt. Die Proben wurden bei 4 °C und 21.912 x g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 70 % (vol/vol) Ethanol gewaschen und anschließend bei 4°C und 21.912 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris pH 8 gelöst.

Alternativ wurde für die Isolierung der *R. radiobacter*-Gesamt-DNA das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) unter Verwendung des Hersteller-Protokolls eingesetzt.

DNA-Extraktionspuffer für <i>R. radiobacter</i>	110 mM Tris pH 8.0 55 mM EDTA 1,54 M NaCl 1,1 % (m/vol) Cetyltrimethylammonium-bromid pH-Wert 8.0
---	---

### 3.5.10. Bestimmung der DNA-Konzentration

Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt. Die Plasmid-Präparation wurde 1:100 in 500 µl Wasser verdünnt und unter Verwendung einer Quarzküvette vermessen oder 1 µl der unverdünnten Plasmid-Präparation wurde auf den NanoDrop pipettiert.

### 3.5.11. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von MWG Eurofins durchgeführt. Die Sequenzierung der Entryvektoren erfolgte mit den durch MWG Eurofins zur Verfügung gestellten Primer M13\_uni (-21) und M13\_rev (-29) (Tab. A7). Alle anderen zur Sequenzierung verwendeten Primer sind in Anhang aufgelistet (Tab. A6, A7, A8). Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm MultAlin (Bioinformatique Genotoul, 2016) ausgewertet. Zur Umwandlung der Reverse-Sequenz wurde das Programm Reverse Complement ([www.bioinformatics.org](http://www.bioinformatics.org), 2016) verwendet. Für die Auswertung der Sequenzierung wurden die in der Genomdatenbank TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), 2016) hinterlegten Sequenzen verwendet.

## 3.6. Transiente Transformation von *N. benthamiana*

### 3.6.1. Anzucht von *R. radiobacter* und Infiltration

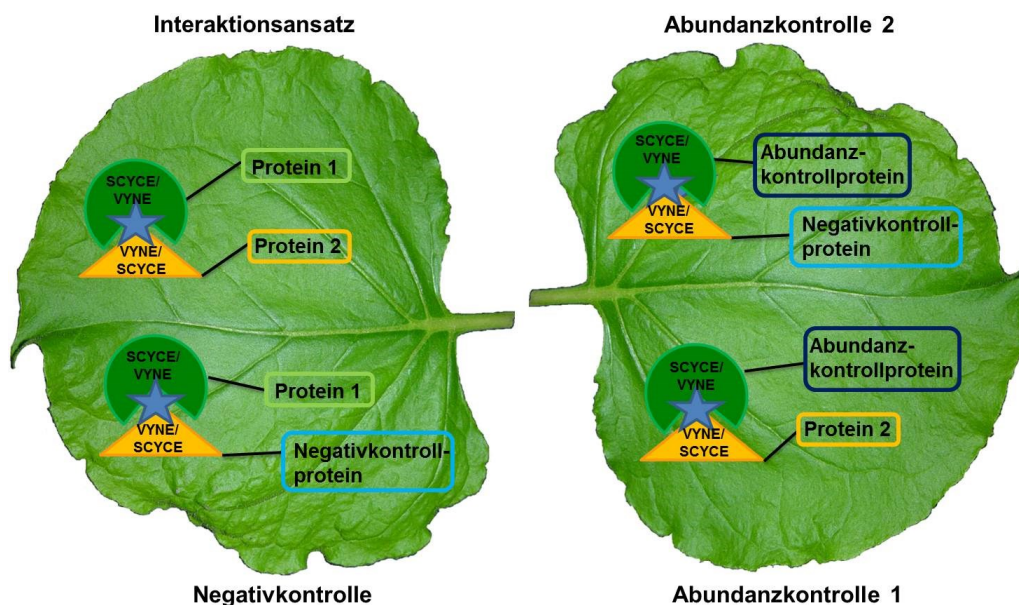
*R. radiobacter*-Kryokulturen, die das jeweilige Expressionskonstrukt enthielten, wurden auf CPY-Platten mit Rifampicin (50 µg/ml), Gentamycin (20 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) bzw. Spectinomycin (50 µg/ml) ausgestrichen, der 19K-Helferstamm [Koncz und Schell, 1986] auf CPY-Platten mit Rifampicin (50 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml). Alle Expressionsvektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind Tabelle 5 zu entnehmen (siehe 2.2.). Die Platten inkubierten ein bis zwei Tage bei 28°C. 9 ml CPY-Flüssigmedium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, wurde mit zwei Kolonien inokuliert. Die Kulturen wurden 20-24 h bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden in sterile 15 ml Röhrchen überführt und für 20 min bei 3145 x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Aktivierungsmedium resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurde mit Hilfe des Aktivierungsmediums auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bzw. 0,9 ± 0,02 eingestellt. Bestanden die Ansätze aus zwei Expressionskonstrukten und dem 19K-Helferstamm wurden sie im Verhältnis 1:1:1 (vol/vol/vol) gemischt. Bestanden die Ansätze aus einem Expressionskonstrukt und dem 19K-Helferstamm wurden sie im Verhältnis 1:1 (vol/vol) gemischt. Alle Infiltrationsansätze wurden für 2 h bei RT und rund 100 rpm inkubiert. Die Blätter von *N. benthamiana* wurden mittels 10 ml Einmalspritzen über die untere Epidermis mit der *R. radiobacter*-Suspension infiltriert. Die Pflanzen wurden danach drei bis fünf Tage in den Gewächshäusern des Instituts für Pflanzenbiologie (TU Braunschweig) inkubiert.

Aktivierungsmedium	0,5 M MES pH 5.6			
	1 M MgCl <sub>2</sub>			
	150	mM	Acetosyringon	in
	Dimethylsulfoxid			



### 3.6.2. Infiltrationsschema

Für *in planta*-Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden die *R. radiobacter*-Suspensionen nach einem bestimmten Schema infiltriert, um die Vergleichbarkeit der Ansätze zu kontrollieren (Abb. 6). Neben Interaktionsansätzen wurden auch Negativ- und Abundanzkontrollen untersucht. Die *R. radiobacter*-Suspension des Interaktionsansatzes wurde in eine Blatthälfte und die der Negativkontrolle in die andere Blatthälfte des gleichen Blattes infiltriert (Abb. 6). Die *R. radiobacter*-Suspensionen der beiden Abundanzkontrollen wurden in die Blatthälften des gegenüberliegenden Blattes infiltriert (Abb. 6). Der Interaktionsansatz enthielt die Expressionskonstrukte der zu untersuchenden Interaktionspartner (Abb. 6). Die Negativkontrolle enthielt neben dem Expressionskonstrukt eines Interaktionspartners das Expressionskonstrukt eines Proteins, das mit dem Interaktionspartner nicht in Wechselwirkung treten sollte (Abb. 6). Die erste Abundanzkontrolle enthielt das Expressionskonstrukt des nicht in der Negativkontrolle enthaltenen Interaktionspartners und das Expressionskonstrukts eines Kontrollproteins, das weder mit dem zu untersuchenden Interaktionspartner noch mit dem Protein der Negativkontrolle in Wechselwirkung treten sollte (Abb. 6). Die zweite Abundanzkontrolle enthielt statt des Expressionskonstrukts des Interaktionspartners das Expressionskonstrukt für das Protein der Negativkontrolle (Abb. 6).



**Abbildung 6: Infiltrationsschema für *in planta*-Protein-Protein-Interaktionsstudien.** In eine Blatthälfte wurde mittels *R. radiobacter*-Suspension der Interaktionsansatz mit den Expressionskonstrukten der zu untersuchenden Proteine 1 und 2 infiltriert, in die andere Blatthälfte des gleichen Blattes die *R. radiobacter*-Suspension der Negativkontrolle bestehend aus dem Expressionskonstrukt von Protein 1 und dem Expressionskonstrukt des Negativkontrollproteins. In das gegenüberliegende Blatt wurden die *R. radiobacter*-Suspensionen der Abundanzkontrollen infiltriert. In eine Blatthälfte wurde die Abundanzkontrolle bestehend aus dem Expressionskonstrukt des Abundanzkontrollproteins und dem Expressionskonstrukt von Protein 2 infiltriert. In die andere Blatthälfte wurde die zweite Abundanzkontrolle infiltriert, die statt des Expressionskonstrukts von Protein 2 das Expressionskonstrukt des Negativkontrollproteins enthielt.

Für Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen im Blattextrakt wurden die Interaktionspartner durch separate Infiltration in jeweils einer Hälfte des gleichen Blattes

produziert. Die Proteine der Negativkontrolle wurden im gegenüberliegenden Blatt produziert.

### **3.7. Untersuchung von Blättern mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM)**

Drei bis fünf Tage nach der Infiltration wurden Blätter von *N. benthamiana* für Interaktions- und Lokalisationsstudien mittels cLSM ausgewertet. Die Auswertung fand in Kooperation mit Dr. David Kaufholdt (AG Hänsch, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig) statt. Die Untersuchungen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop cLSM-510META durchgeführt. Dieses war an ein Axiovert 200M (Carl Zeiss, [www.zeiss.de](http://www.zeiss.de)) gekoppelt. Für Interaktionsstudien wurde das Objektiv PlanNeofluar 10x/0,3 verwendet, für Lokalisationsstudien zusätzlich das Wasserimmersions-Objektiv C-Apochromat 40x/1,2. Zwischen unabhängigen Experimenten oder verschiedenen Bildaufnahmen konnten Variationen in Laserintensität, Detektorstärke und Pinhole auftreten. Innerhalb der Analyse eines Blattpaares wurden die Mikroskop-Einstellungen nicht verändert, um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für die Anregung des BiFC-Komplexes und von Venus wurde der Argon-Laser mit 488 nm (Lasos, LGK 7814 ML4) eingesetzt und die Fluoreszenzen wurden im Lambda- oder Channel-Modus unter Verwendung des dichroischen Spiegels HFT UV/488/543/633 und des Bandpass-Filters von 505-530 vor dem Detektor aufgenommen. Für die Anregung von mCherry wurde der Helium-Neon-Laser mit 543 nm (Lasos, LGK 7786 P) eingesetzt und die Fluoreszenzen wurden im Lambda-Modus unter Verwendung des dichroischen Spiegels HFT UV/488/543/633 und des Bandpass-Filters von 560-615 vor dem Detektor aufgenommen. Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss AIM Version 3.5).

Für ein unabhängiges Experiment wurden zwischen zwei und fünf Pflanzen ausgewertet. Pro infiltriertem Blatt wurden ein bis zwei Blattscheiben ausgestanzt und über die Blattunterseite mittels cLSM ausgewertet. Das verwendete Medium war autoklaviertes Wasser bei 25°C.

### **3.8. Untersuchung von Pflanzenextrakten mittels cLSM**

Pro Konstrukt wurden zwei bis vier, später acht bis zehn Blatthälften, mit einer Spatelspitze Seesand versetzt und im Mörser zerrieben. Das gemörserte Blattmaterial wurde in Kryoröhrchen überführt und pro Gramm Blattmaterial mit 4 ml Puffer versetzt, später wurde pro Ansatz 1 ml Puffer hinzugegeben. Die verwendeten Puffer sind Tabelle 17 zu entnehmen. Einige Proben wurde pro 1 ml Puffer mit 2 µl 5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; AppliChem, Darmstadt) in Ethanol versetzt. Proben, die VYNE- oder SCYCE-Konstrukte enthielten, wurden zusätzlich mit zwei Spatelspitzen Polyvinylpyrrolidon (PVPP) versetzt.

Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und anschließend 20-30 min bei 21.912 x g oder 3 h bei 101.727 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, der pH-Wert überprüft und bei Bedarf mit dem entsprechenden Puffer auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Proben wurden über die Ultrafiltrationseinheit Vivaspin® Turbo mit einer Porengröße von 100 kDa bei 3000 x g filtriert und über die Ultrafiltrationseinheit Vivaspin® mit einer Porengröße von 10 kDa bei 3000-6000 x g auf ein Volumen von rund 50-100 µl

aufkonzentriert. Für Interaktionsansätze mit VYNE- und SCYCE-Konstrukten wurde nur der obere hellere Teil der Lösung nach der Zentrifugation abgenommen. Im Interaktionsansatz wurden die beiden zu untersuchenden Interaktionspartner in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vereinigt und bei RT bzw. 4°C und Dunkelheit 1-3 h bzw. über Nacht inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt neben einem Interaktionspartner ein Kontrollprotein und wurde wie der Interaktionsansatz behandelt. Die Extrakte wurden mittels cLSM analysiert (siehe 3.7.). Hierfür wurde 2 µl Extrakt auf einen Objektträger pipettiert und der Objektträger wurde so unter das Inversmikroskop gelegt, dass der Tropfen in Richtung des Objektivs hing.

**Tabelle 17: Verwendete Puffer zur Extrakterstellung.**

Puffer
Extraktionspuffer, pH 8, mit und ohne Zusatz von PMSF
50 mM MES, pH 6
10 mM Tris, pH 7
10 mM Tris, pH 8, mit und ohne Zugabe von PMSF
10 mM Tris, pH 9

Extraktionspuffer, pH 8

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
10 % (vol/vol) Glycerol  
pH-Wert 8

### 3.9. Nachweis von Myrosinase- und NSP-Aktivität in transient transformiertem *N. benthamiana*

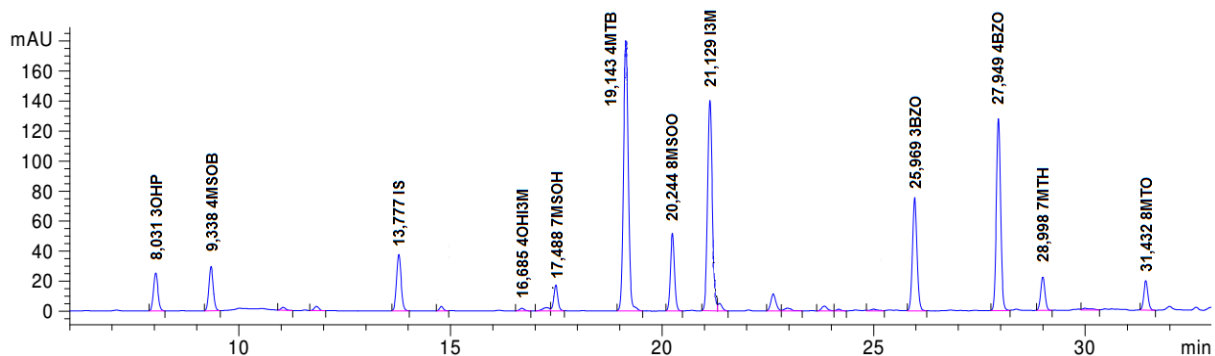
Pro Konstrukt wurden sechs bis acht Blatthälften mit einer Spatelspitze Seesand versetzt und gemörsert. Das gemörserte Blattmaterial wurde in Kryoröhrchen überführt. Pro Gramm Blattmaterial wurde 500 µl 50 mM MES-Puffer pH 6 hinzugegeben. Die Proben wurden bei 21.912 x g und 4°C für 20-30 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und als Extrakt verwendet. Jede Probe wurde mit 1 µl/100µl 100 mM Benzylglucosinolat versetzt. Proben, die spezifizierende Proteine oder At3g07720 enthielten, wurden mit 0,1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] versetzt, sodass im Assay eine Endkonzentration von 0,01 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] vorlag. Alle Proben wurden 40 min bei RT inkubiert, mit 50-70 µl des internen Standards Phenylcyanid (1:10.000 (vol/vol) in MeOH) versetzt und zweimal mit 1500 µl Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach jedem Ausschütteln wurden die Proben 15-20 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden, wie in 3.3.1. beschrieben, weiterverarbeitet und mittels GC-MS vermessen (siehe 3.3.2.).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einfluss der T-DNA-Insertion in *AtNSP1-AtNSP5* auf das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte in *A. thaliana* Col-0

#### 4.1.1. Glucosinolat-Abbauprodukte in Samen des Wildtyps

Um zu untersuchen, welche Typen von Glucosinolat-Abbauprodukten Samen von *A. thaliana* Col-0 bei Gewebeerstörung bilden, wurden wässrige Samenhomogenate hergestellt und die gebildeten Produkte der Glucosinolat-Hydrolyse qualitativ und quantitativ erfasst. Das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte wurde mit dem Glucosinolatprofil der Samen (Abb. 7) verglichen, um eine Aussage über die Wiederfindung der Abbauprodukte zu machen.



**Abbildung 7: Profil der Glucosinolate in Samen von *A. thaliana* Col-0.** Gezeigt ist ein HPLC-Chromatogramm der Desulfoglucosinolate. Die Retentionszeiten und Seitenketten der Desulfoglucosinolate sind angegeben. Die Samen wurden innerhalb einer Woche nach der Ernte vermessen. IS, interner Standard.

Für die Samen des Wildtyps wurden folgende Glucosinolate detektiert: 3OHP-, 4MSOB-, 4MTB-, 7MSOH-, 8MSOO-, 7MTH-, 8MTO, I3M-, 4OHI3M-, 3BZO- sowie 4BZO-Glucosinolat (Abb. 7; Tab. 1). Hauptglucosinolat in Samen des Wildtyps war das 4MTB-Glucosinolat (Tab. A10). Alle anderen Glucosinolate wurden in geringen Mengen detektiert (Tab. A10). Im wässrigen Samenhomogenat des Wildtyps wurden folgende Glucosinolat-Abbauprodukte detektiert: Das Nitril und das Isothiocyanat des 4MSOB-, 4MTB-, 5MTP-, 7MTH-, 8MTO-, 3BZO- und 4BZO-Glucosinolats (Abb. 8B; Tab.18). Die größten Mengen an Abbauprodukten wurden für das aliphatische Hauptglucosinolat 4MTB-Glucosinolat gefunden (Abb. 8B). Obwohl die Samen des Wildtyps 3OHP-, 7MSOH-, 8MSOO-, I3M- und 4OHI3M-Glucosinolat enthielten, wurden ihre Abbauprodukte nicht detektiert. Vermutlich war die Menge an eingesetzten Samen bei geringer Wiederfindung zu gering, sodass der Gehalt der Abbauprodukte unter der Nachweisgrenze lag. Außerdem sind die in dieser Arbeit verwendeten Methoden, GC-MS und GC-FID, nicht geeignet Isothiocyanate der Indol-Glucosinolate und die daraus entstehenden Abbauprodukte nachzuweisen. Daher wurde der Fokus auf das aliphatische Hauptglucosinolat, 4MTB-Glucosinolat, gelegt.

4MTB-Glucosinolat wurde im Homogenat des Wildtyps vorwiegend zum Nitril abgebaut (> 90 % Nitril, < 10 % Isothiocyanat) (Abb. 8B). Nitril und Isothiocyanat des 4MSOB-, 7MTH- und 8MTO-Glucosinolats wurden in geringen Mengen im Homogenat des Wildtyps detektiert, wobei der Gehalt an Nitril wesentlich höher war als der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat (Tab. 18). Nitril und Isothiocyanat des 5MTP-Glucosinolats wurden im Homogenat des Wildtyps detektiert (Tab. 18), obwohl das Glucosinolat selber nicht

nachweisbar war. Im Homogenat des Wildtyps wurde 5MTP-Glucosinolat vor allem zum Nitril abgebaut (Tab. 18). Insgesamt zeigte sich also, dass die Samen bei Gewebeerstörung vorwiegend Nitrile (> 90 %) und kaum Isothiocyanate bilden. Beim Vergleich der absoluten Menge der im Homogenat enthaltenen Abbauprodukte mit dem Glucosinolatgehalt der Samen fiel auf, dass nur ein geringer Prozentsatz des Glucosinolatgehalts in Form von Abbauprodukten wiedergefunden wurde (Tab. 18, A10). Dies könnte auf einen unvollständigen Abbau der Glucosinolate im Homogenat oder eine schlechte analytische Wiederfindung hindeuten. Da nur für wenige Glucosinolat-Abbauprodukte Standardsubstanzen zur Verfügung stehen, konnte die analytische Wiederfindung nicht genauer untersucht werden.

Um zu überprüfen, ob der Glucosinolatabbau in wässrigen Homogenaten der Samen vollständig abläuft, wurde der Gehalt an intaktem Glucosinolat im wässrigen Homogenat bestimmt. Im wässrigen Homogenat des Wildtyps wurde intaktes 4MTB-Glucosinolat detektiert (Abb. 8C; Tab. A11). Wurde die Summe aus intaktem 4MTB-Glucosinolat und den Abbauprodukten Nitril und Isothiocyanat im Homogenat betrachtet, war sie im Mittel vergleichbar hoch wie der Gehalt an 4MTB-Glucosinolat in den Samen (Tab. A10, A12). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass der große Anteil des Nitrils an der Gesamtmenge der 4MTB-Glucosinolat-Abbauprodukte nur durch eine schlechte Wiederfindung des Isothiocyanats bedingt war. Insgesamt wurde gezeigt, dass die Wiederfindung der Abbauprodukte des 4MTB-Glucosinolats, insbesondere die des Nitrils, im Samenhomogenat des Wildtyps gut war und alle Produkte erfasst wurden. Im wässrigen Samenhomogenat des Wildtyps wurde außerdem intaktes 3OHP-, 3BZO-, 4BZO-, 4MSOB-, 7MSOH-, 8MSOO-, 7MTH-, 8MTO-, I3M- und 4OHI3M-Glucosinolat detektiert (Tab. A11). Wegen der oben erwähnten Schwierigkeiten bei der Detektion und Quantifizierung der Abbauprodukte dieser Glucosinolate wurden diese Glucosinolate nicht weiter betrachtet. Für das aliphatische Hauptglucosinolat 4MTB-Glucosinolat konnte festgestellt werden, dass in einigen Samenchargen im wässrigen Homogenat nur ein unvollständiger Glucosinolatabbau eintritt.

### **4.1.2. Expression von *AtNSP1-AtNSP5* in Samen des Wildtyps und der T-DNA-Mutanten**

Um zu ermitteln, welche *AtNSPs* in Samen exprimiert werden und daraus folgend für die Nitrilbildung bei Glucosinolatabbau verantwortlich sein könnten, wurde die Expression der *AtNSPs* im Wildtyp bestimmt. Mittels RT-PCR wurde nur das *AtNSP2*-Transkript in Samen des Wildtyps detektiert (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Eine quantitative PCR (qPCR)-Analyse bestätigte diese Aussage (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Zusätzlich wurden mittels qPCR geringe *AtNSP5*-Transkriptlevel in den Samen detektiert (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Eine Expression von *AtNSP1*, *AtNSP3* und *AtNSP4* ließ sich in Samen nicht nachweisen (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Um zu überprüfen, ob die T-DNA-Insertion in *AtNSP1-AtNSP5* zu einer Ausschaltung der Gene führte, wurde parallel die Expression von *AtNSP1-AtNSP5* in den Samen der T-DNA-Mutanten (Tab. 7) analysiert. Das *AtNSP2*-Transkript war in *nsp2-1* und *nsp2-2* nicht mehr nachweisbar (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Somit handelte es sich bei *nsp2-1* und *nsp2-2* um Knock-out-Mutanten. Die Expression des *AtNSP5*-Transkripts in *nsp5-1* war herunterreguliert (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Somit wirkte sich die T-DNA-Insertion in *AtNSP5* (*nsp5-1*) auf das Transkriptionsniveau von *AtNSP5* aus. Das Transkriptionsniveau von *AtNSP5* wurde

durch die T-DNA-Insertion in *AtNSP2* (*nsp2-1* und *nsp2-2*) um rund 25 % hochreguliert, ebenso das Transkriptionsniveau von *AtNSP2* durch die T-DNA-Insertion in *AtNSP5* (*nsp5-1*) (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Das Transkriptionsniveau aller anderen *AtNSPs* wurde durch die T-DNA-Insertion in *AtNSP2* bzw. *AtNSP5* nicht beeinflusst (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Eine T-DNA-Insertion in *AtNSP1*, *AtNSP3* und *AtNSP4* führte nicht zu einer Veränderung des im Wildtyp gefundenen Expressionsmusters der *AtNSPs*.

### 4.1.3. Glucosinolat-Abbauprodukte in Samen der T-DNA-Mutanten

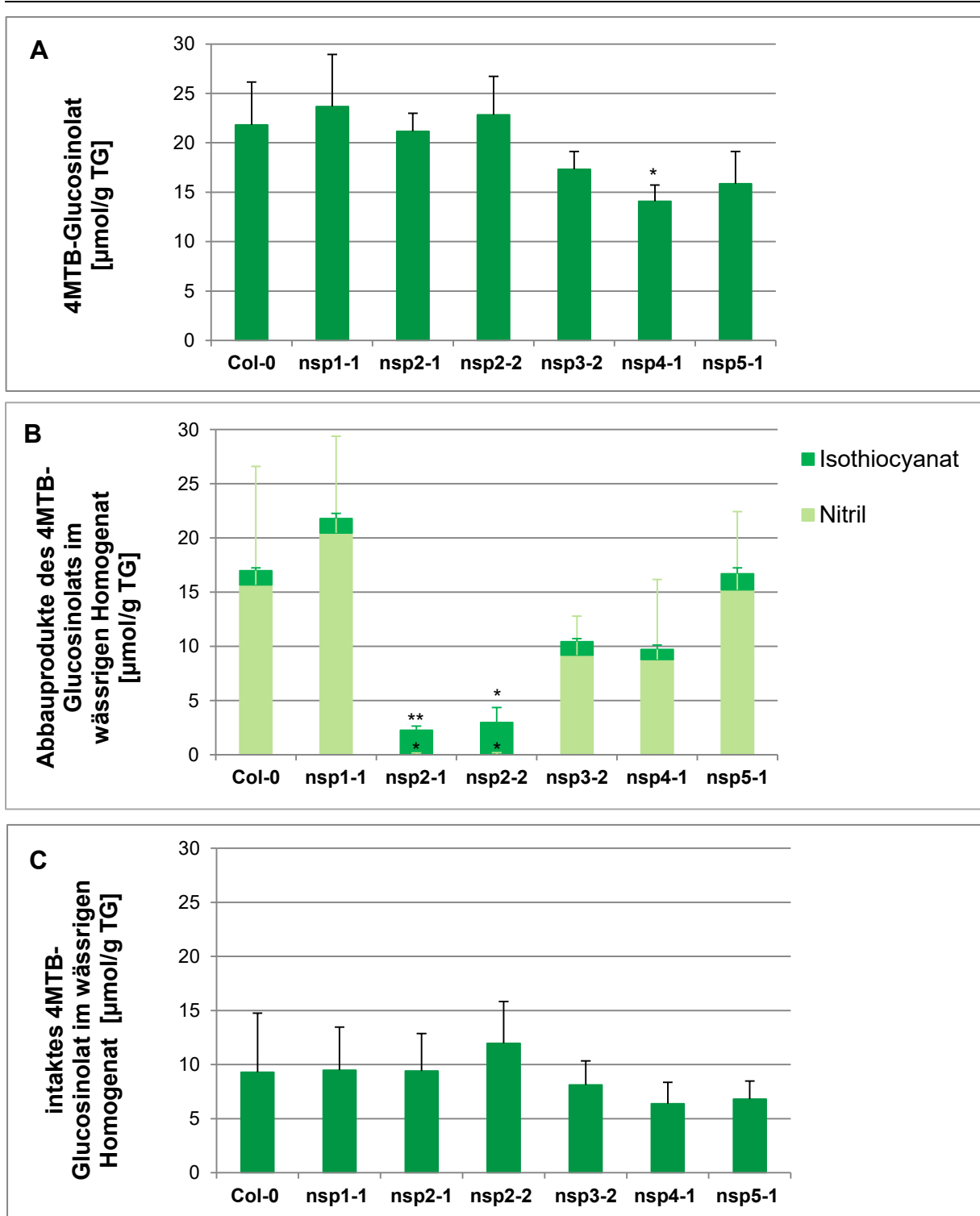
Um zu untersuchen, ob die T-DNA-Insertion in *AtNSP2* bzw. *AtNSP5* einen Einfluss auf die Bildung der Glucosinolat-Abbauprodukte in Samenhomogenaten hat, wurden die Abbauprodukte des aliphatischen Hauptglucosinolats, 4MTB-Glucosinolat, in wässrigen Homogenaten der T-DNA-Mutanten mit denen in wässrigen Homogenaten des Wildtyps und der T-DNA-Mutanten anderer *AtNSP*-Gene verglichen. In Homogenaten der T-DNA-Mutanten, mit Ausnahme von *nsp2-1* und *nsp2-2*, wurde wie im Homogenat des Wildtyps viel Nitril und wenig Isothiocyanat des 4MTB-Glucosinolats detektiert (Abb. 8B). In Samenhomogenaten von *nsp2-1* und *nsp2-2* hingegen machte das Isothiocyanat des 4MTB-Glucosinolats 97-98 % der Gesamtmenge der 4MTB-Glucosinolat-Abbauprodukte aus, das dazugehörige Nitril 2-3 %. Der Gehalt an Nitril des 4MTB-Glucosinolats war in Homogenaten von *nsp2-1* und *nsp2-2* signifikant kleiner, der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat signifikant höher als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 8B). Insgesamt war der Gehalt an Abbauprodukten des 4MTB-Glucosinolats in Homogenaten von *nsp2-1* und *nsp2-2* im Mittel deutlich niedriger als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 8B). Der Gehalt an 4MTB-Glucosinolat in Samen wurde durch die T-DNA-Insertion in *AtNSP2* (*nsp2-1* und *nsp2-2*) aber nicht beeinflusst (Abb. 8A). Die geringe Menge detektierter Abbauprodukte in Homogenaten von *nsp2-1* und *nsp2-2* könnte die Folge eines unvollständigen Abbaus oder der schlechten analytischen Wiederfindung des Isothiocyanats des 4MTB-Glucosinolats aufgrund seiner Reaktivität sein. Da sich die Menge an intaktem 4MTB-Glucosinolat in Homogenaten von *nsp2-1* und *nsp2-2* jedoch nicht von der in Homogenaten des Wildtyps und der anderen T-DNA-Mutanten unterschied (Abb. 8C), ist eine schlechte Wiederfindung des Isothiocyanats des 4MTB-Glucosinolats die wahrscheinlichere Ursache. Der Gehalt an Nitril des 4MTB-Glucosinolats war in Homogenaten von *nsp3-2* und *nsp4-1* im Mittel etwas geringer als im Homogenat des Wildtyps, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 8B). Die Samenhomogenate von *nsp1-1* und *nsp5-1* unterschieden sich nicht signifikant von dem Homogenat des Wildtyps (Abb. 8B). Insgesamt wurde also festgestellt, dass nur die T-DNA-Insertion in *AtNSP2* (*nsp2-1* und *nsp2-2*) einen Einfluss auf die Art und Menge der aus 4MTB-Glucosinolat gebildeten Abbauprodukte hat. Bei Ausschaltung von *AtNSP2* wurden im Samenhomogenat nur sehr geringe Mengen des Nitrils des Hauptglucosinolats 4MTB-Glucosinolat gebildet.

Die für den Abbau des 4MTB-Glucosinolats gefundenen Ergebnisse ließen sich prinzipiell auch für den Abbau der anderen Glucosinolate zeigen (Tab. 18). In Samenhomogenaten von *nsp2-1* und *nsp2-2* wurden keine oder nur sehr geringe Mengen der Nitrile von 5MTP-, 7MTH-, 8MTO-, 4MSOB-, 3BZO- und 4BZO-Glucosinolat detektiert, dafür aber im Mittel mehr Isothiocyanat als im Homogenat des Wildtyps (Tab. 18). Die Unterschiede zwischen *nsp2-1* bzw. *nsp2-2* und Wildtyp waren teilweise signifikant (Tab. 18). Die Ausschaltung von *AtNSP1* führte zwar im Mittel zu einem leicht erhöhten Gehalt der Nitrile von 5MTP-, 7MTH-, 8MTO-, 4MSOB- und 4BZO-Glucosinolat im Samenhomogenat verglichen mit dem Wildtyp,

diese Unterschiede waren aber in keinem Fall signifikant (Tab. 18). Geringe Veränderungen im Gehalt des Isothiocyanats dieser Glucosinolate im Homogenat von *nsp1-1* im Vergleich zum Homogenat des Wildtyps waren ebenfalls nicht signifikant (Tab. 18). Die Ausschaltung von *AtNSP5* führte zwar im Mittel zu einem leicht erhöhten Gehalt der Nitrile von 5MTP-, 7MTH-, 8MTO-, 3BZO- und 4BZO-Glucosinolat im Samenhomogenat verglichen mit dem Wildtyp, diese Unterschiede waren aber in keinem Fall signifikant (Tab. 18). Geringe Veränderungen im Gehalt des Isothiocyanats dieser Glucosinolate im Homogenat von *nsp5-1* im Vergleich zum Homogenat des Wildtyps waren ebenfalls nicht signifikant (Tab. 18). Die Ausschaltung von *AtNSP3* bzw. *AtNSP4* führte zwar tendenziell zu einer geringen Abnahme im Gehalt des Nitrils der Nebenglucosinolate und zu einer geringen Zunahme an korrespondierendem Isothiocyanat im Samenhomogenat verglichen mit dem Wildtyp, diese Unterschiede waren aber nicht signifikant (Tab. 18). Wie in 4.1.1. beschrieben, entsprach das Profil der Abbauprodukte der Nebenglucosinolate im Wildtyp nicht dem auf Basis des Glucosinolatgehalts erwarteten Profil. Während das 5MTP-Glucosinolat nur in Form der Abbauprodukte detektiert wurde, wurden keine Abbauprodukte der in Samen detektierten Glucosinolate 7MSOH- und 8MSOO-Glucosinolat gefunden. Diese Schwierigkeiten in der Erfassung der Glucosinolate und ihrer Abbauprodukte erschwerte die Interpretation der für den Abbau der Nebenglucosinolate erhaltenen Daten. Zudem war der Abbau in Homogenaten des Wildtyps und der T-DNA-Mutanten unvollständig (Tab. A11). Schlussfolgerungen über die Rolle von *AtNSP1-AtNSP5* für die Nitrilbildung in Samen sollten daher nur auf Basis des aliphatischen Hauptglucosinolats 4MTB-Glucosinolat gezogen werden.

Anhand der erhaltenen Daten wurde auch geprüft, ob die T-DNA-Insertion in *AtNSP1-AtNSP5* einen Einfluss auf den Glucosinolatgehalt der Samen hat. Der Gehalt an 4MTB-Glucosinolat war in *nsp4-1* signifikant niedriger als im Wildtyp (Abb. 8A). Der Gehalt an 4MSOB-Glucosinolat war in *nsp2-1*, *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* signifikant niedriger, in *nsp2-2* signifikant höher als im Wildtyp (Tab. A10). Es wurden insgesamt jedoch keine Unterschiede im Glucosinolatgehalt gefunden, die die Veränderungen im Gehalt der Abbauprodukte erklären könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in wässrigen Homogenaten der Samen ein Glucosinolatabbau stattfand, jedoch blieb ein Teil der Glucosinolate intakt. Der Glucosinolatabbau lief somit nicht vollständig ab. Im Homogenat des Wildtyps wurde generell fast ausschließlich Nitril detektiert. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP2* führte in zwei unabhängigen Linien zu einer Reduktion des Nitrilgehalts in wässrigen Homogenaten der Samen relativ zum Wildtyp. Für das Hauptglucosinolat, 4MTB-Glucosinolat, war dies gut reproduzierbar und aufgrund der guten Wiederfindung seiner Abbauprodukte gut abzusichern. Die T-DNA-Insertion in den anderen *AtNSP*-Genen hatte keinen vergleichbaren Effekt. Demnach ist *AtNSP2* für die Nitrilbildung in Samen verantwortlich. Weitere *AtNSPs* sind an der Nitrilbildung in Samen nicht wesentlich beteiligt.



**Abbildung 8: Abbau von 4MTB-Glucosinolat in Homogenaten der Samen von *A. thaliana*.** Der Glucosinolatgehalt der Samen wurde über Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt (A). Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert (B). Intakte Glucosinolate im wässrigen Homogenat wurden als Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt (C). Die Samen wurden innerhalb einer Woche nach der Ernte vermessen. Dargestellt wurde der Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) in  $\mu\text{mol/g}$  Trockengewicht (TG) aus  $n = 4$  (A, B) oder  $n = 3$  (C) unabhängig geernteten Samenpools. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , t-Test.



**Tabelle 18: Abbau der Nebenglucosinolate in Homogenaten der Samen von *A. thaliana*.** Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Die Samen wurden innerhalb einer Woche nach der Ernte vermessen. Angegeben wurde der MW  $\pm$  SD in  $\mu\text{mol/g}$  TG aus  $n = 4$  unabhängig geernteten Samenpools. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp, \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney Test. # Signifikanztest nicht anwendbar.

	5MTP-CN	5MTP-NCS	7MTH-CN	7MTH-NCS
<b>Col-0</b>	1,12 $\pm$ 0,68	0,03 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,46	0,16 $\pm$ 0,09
<b>nsp1-1</b>	1,56 $\pm$ 0,606	0,04 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,31	0,14 $\pm$ 0,05
<b>nsp2-1</b>	0,08 $\pm$ 0,16*	0,10 $\pm$ 0,07	0 #	0,31 $\pm$ 0,08*
<b>nsp2-2</b>	0,09 $\pm$ 0,17*	0,15 $\pm$ 0,12	0 #	0,48 $\pm$ 0,42
<b>nsp3-2</b>	0,93 $\pm$ 0,62	0,04 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,24	0,17 $\pm$ 0,06
<b>nsp4-1</b>	0,83 $\pm$ 0,33	0,05 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,28	0,21 $\pm$ 0,16
<b>nsp5-1</b>	1,53 $\pm$ 0,10	0,05 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,77	0,26 $\pm$ 0,21

	8MTO-CN	8MTO-NCS	4MSOB-CN	4MSOB-NCS
<b>Col-0</b>	0,29 $\pm$ 0,16	0,11 $\pm$ 0,7	0,25 $\pm$ 0,42	0,07 $\pm$ 0,09
<b>nsp1-1</b>	0,33 $\pm$ 0,14	0,12 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,43	0,11 $\pm$ 0,16
<b>nsp2-1</b>	0 #	0,24 $\pm$ 0,07*	0 #	0,21 $\pm$ 0,23
<b>nsp2-2</b>	0 #	0,28 $\pm$ 0,17	0 #	0,19 $\pm$ 0,22
<b>nsp3-2</b>	0,23 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,09
<b>nsp4-1</b>	0,30 $\pm$ 0,14	0,22 $\pm$ 0,18	0,10 $\pm$ 0,18	0,04 $\pm$ 0,04
<b>nsp5-1</b>	0,53 $\pm$ 0,38	0,29 $\pm$ 0,28	0,20 $\pm$ 0,29	0,02 $\pm$ 0,05

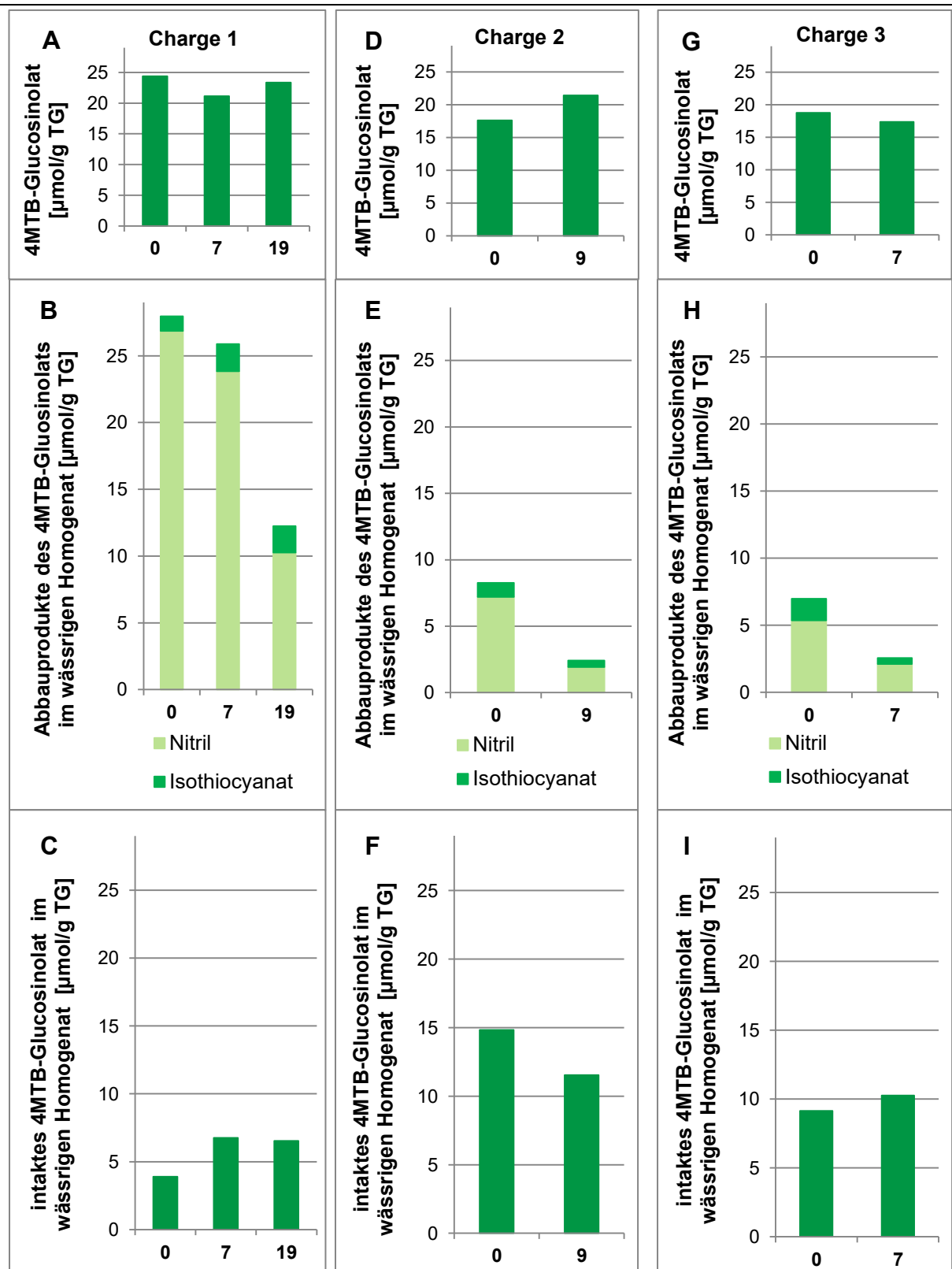
	3BZO-CN	3BZO-NCS	4BZO-CN	4BZO-NCS
<b>Col-0</b>	0,96 $\pm$ 0,97	0,04 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,77	0,12 $\pm$ 0,10
<b>nsp1-1</b>	0,94 $\pm$ 0,86	0,05 $\pm$ 0,04	1,67 $\pm$ 0,83	0,20 $\pm$ 0,15
<b>nsp2-1</b>	0,01 $\pm$ 0,03*	0,10 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,02*	0,29 $\pm$ 0,05*
<b>nsp2-2</b>	0,01 $\pm$ 0,02*	0,12 $\pm$ 0,11	0,01 $\pm$ 0,02*	0,40 $\pm$ 0,27
<b>nsp3-2</b>	0,61 $\pm$ 0,28	0,05 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,60	0,16 $\pm$ 0,10
<b>nsp4-1</b>	0,76 $\pm$ 0,84	0,08 $\pm$ 0,05	1,46 $\pm$ 1,24	0,19 $\pm$ 0,10
<b>nsp5-1</b>	1,30 $\pm$ 0,87	0,09 $\pm$ 0,10	2,63 $\pm$ 1,68	0,29 $\pm$ 0,23

#### 4.1.4. Einfluss der Lagerungsdauer von Samen auf den Gehalt an Glucosinolaten und ihren Abbau in wässrigen Homogenaten

In früheren Untersuchungen waren in wässrigen Homogenaten der Samen des *A. thaliana*-Wildtyps kaum Glucosinolat-Abbauprodukte detektierbar [Dörr, 2014]. Die Samen wurden anders als in der vorliegenden Arbeit erst sechs Monate nach der Ernte analysiert. Um zu untersuchen, ob die Lagerungsdauer einen Einfluss auf den Glucosinolatgehalt und den Abbau der Glucosinolate bei Gewebeerstörung hat, wurden drei der in 4.1.1. und 4.1.3. vermessenen unabhängig geernteten Samenpools über mehrere Monate gelagert und anschließend analysiert. Hierbei wurde das Augenmerk auf das Hauptglucosinolat, 4MTB-Glucosinolat, und seine Abbauprodukte gelegt. Direkt nach der Ernte lag der Gehalt an 4MTB-Glucosinolat in Samen des Wildtyps bei allen drei Chargen zwischen 17 und 25  $\mu\text{mol/g}$  TG (Abb. 9A, D, G). Die Summe des im wässrigen Homogenat der Charge 1 detektierten Nitrils und Isothiocyanats des 4MTB-Glucosinolats entsprach etwa dem Gehalt an 4MTB-Glucosinolat in Samen (Abb. 9A, B). Zusätzlich enthielt das wässrige Homogenat der Charge 1 geringe Mengen an intaktem 4MTB-Glucosinolat (Abb. 9C). In Charge 2 und 3 war der Gehalt an Abbauprodukten im wässrigen Homogenat nur etwa halb so groß wie der

Glucosinolatgehalt in Samen (Abb. 9D, E, G, H). Dementsprechend enthielt das wässrige Homogenat der Charge 2 und 3 große Mengen an intaktem 4MTB-Glucosinolat (Abb. 9F, I). Für alle drei Chargen war somit festzustellen, dass der Abbau des 4MTB-Glucosinolats im wässrigen Homogenat des Wildtyps nicht vollständig ablief, auch wenn die Samen direkt nach der Ernte verwendet wurden. Das Ausmaß des Abbaus variierte zwischen den drei untersuchten Samenchargen.

Über die Lagerungszeit von sieben Monaten traten in Samen des Wildtyps der Charge 1 keine wesentlichen Veränderungen im Gehalt des 4MTB-Glucosinolats auf (Abb. 9A). Im Gehalt seiner Abbauprodukte im wässrigen Homogenat des Wildtyps wurden nach sieben Monaten ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zum Homogenat des Ausgangszeitpunkts festgestellt (Abb. 9B). Auch der Gehalt an intaktem 4MTB-Glucosinolat im wässrigen Homogenat des Wildtyps veränderte sich über die Lagerungszeit von sieben Monaten nicht (Abb. 9C). Nach neunzehn Monaten Lagerungszeit trat im 4MTB-Glucosinolatgehalt der Samencharge 1 keine wesentliche Veränderung im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt auf (Abb. 9A). Jedoch nahm der Gehalt an Abbauprodukten des 4MTB-Glucosinolats im wässrigen Homogenat um rund 50 % ab (Abb. 9B). Im Gehalt des intakten 4MTB-Glucosinolats im wässrigen Homogenat des Wildtyps war nach neunzehn Monaten keine wesentliche Veränderung sichtbar (Abb. 9C). In der Charge 2 trat nach neun Monaten Lagerungszeit keine wesentliche Veränderung im Gehalt des 4MTB-Glucosinolats auf (Abb. 9D). Im Gehalt der Abbauprodukte im wässrigen Homogenat war eine Abnahme um rund 70 % im Vergleich zum Homogenat des Ausgangszeitpunkts erkennbar (Abb. 9E). Außerdem wurde nach neun Monaten etwas weniger intaktes 4MTB-Glucosinolat im wässrigen Homogenat detektiert als im Homogenat des Ausgangszeitpunkts (Abb. 9F). In der Charge 3 trat nach sieben Monaten Lagerungszeit keine wesentliche Veränderung im Gehalt des 4MTB-Glucosinolats im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt auf (Abb. 9G). Jedoch war der Gehalt an Abbauprodukten im wässrigen Homogenat nach sieben Monaten um rund 70 % niedriger als im Homogenat des Ausgangszeitpunkts (Abb. 9H). Der Gehalt an intaktem 4MTB-Glucosinolat im wässrigen Homogenat des Wildtyps zeigte keine wesentliche Veränderung über die Lagerungszeit von sieben Monaten (Abb. 9I). Insgesamt wurde festgestellt, dass die Lagerungsdauer der Samen einen Einfluss auf den Gehalt der 4MTB-Glucosinolat-Abbauprodukte im wässrigen Homogenat des Wildtyps hat: Der Gehalt an Abbauprodukten nahm in Homogenaten des Wildtyps aller drei Chargen über die Lagerungszeit um mehr als 50 % ab, obwohl der Glucosinolatgehalt der Samen unverändert blieb. Die Abnahme an Abbauprodukten war besonders gut im Gehalt des Nitrils zu erkennen, da bei Zerstörung der Samen die Glucosinolate vorwiegend zu Nitrilen abgebaut werden (siehe 4.1.1.). Der Gehalt an intaktem Glucosinolat im wässrigen Homogenat des Wildtyps veränderte sich in den drei Chargen über die Lagerungszeit uneinheitlich, jedoch nicht wesentlich. Die Glucosinolate wurden in wässrigen Homogenaten der Samen zwar nicht vollständig abgebaut, aber der Anteil nicht hydrolysierter Glucosinolate stieg nicht im gleichen Maße an wie der Gehalt an Abbauprodukten in wässrigen Homogenaten sich verringerte. Die Aktivität der Myrosinase scheint daher über die Lagerungszeit nicht zu sinken. Da in wässrigen Homogenaten gelagerter Samen vorwiegend das Nitril des 4MTB-Glucosinolats detektiert wurde, ist auch von einer anhaltenden NSP-Aktivität auszugehen. Möglicherweise entstehen beim Glucosinolatabbau im Homogenat gelagerter Samen andere, hier nicht erfasste Produkte.

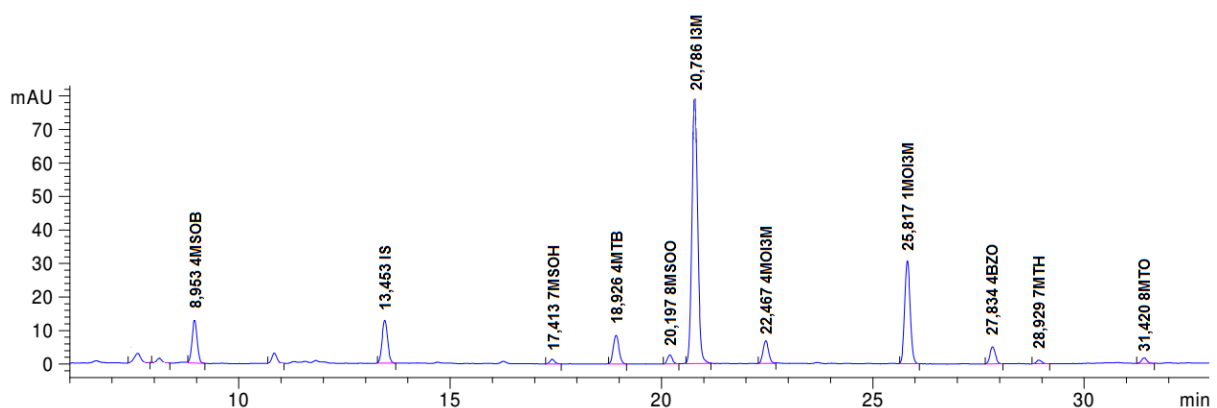


**Abbildung 9: Abbau von 4MTB-Glucosinolat in Homogenaten der Samen von *A. thaliana* Col-0.** Drei unabhängig geerntete Samenpools wurden analysiert (A-C, D-F, G-I). Der Glucosinolatgehalt der Samen wurde über Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt (A, D, G). Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert (B, E, H). Intakte Glucosinolate im wässrigen Homogenat wurden als Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt (C, F, I). Dargestellt wurde der Gehalt in µmol/g TG über die Lagerungszeit in Monaten.

Für die Samen der T-DNA-Mutanten wurden ähnliche Ergebnisse gefunden wie für die Samen des Wildtyps: Der Gehalt an Abbauprodukten nahm in Homogenaten aller untersuchten T-DNA-Mutanten über die Lagerungszeit um rund 50 % ab, obwohl der Glucosinolatgehalt der Samen sich nicht veränderte (Tab. A13, A14). Ausnahme waren die Homogenate von *nsp2-1* und *nsp2-2* der Charge 1 nach sieben und neunzehn Monaten, hier wurde ein Anstieg an Abbauprodukten im Vergleich zum Homogenat des Ausgangszeitpunkts verzeichnet (Tab. A14). Im Homogenat von *nsp4-1* der Charge 1 wurde nach sieben Monaten eine Abnahme der Abbauprodukte um rund ein Fünftel im Vergleich zum Homogenat des Ausgangszeitpunkts beobachtet, nach neunzehn Monaten stieg der Gehalt wieder um ein Drittel an (Tab. A14). Insgesamt war der Gehalt nach neunzehn Monaten jedoch niedriger als zum Ausgangszeitpunkt (Tab. A14). Wie im wässrigen Homogenat des Wildtyps wurden auch in wässrigen Homogenaten der T-DNA-Mutanten aller drei Chargen keine wesentlichen Veränderungen im Gehalt des intakten Glucosinolats über die Lagerungsdauer beobachtet (Tab. A15). Insgesamt bestätigten die Untersuchungen der Samenhomogenate von T-DNA-Mutanten die oben gemachten Aussagen: Wesentliche Veränderungen im Gehalt des Glucosinolats und des intakten Glucosinolats im wässrigen Homogenat traten in gelagerten Samen im Vergleich zu frischen Samen nicht auf. Eine Abnahme der Abbauprodukte wurde in allen Homogenaten der untersuchten T-DNA-Mutanten, mit Ausnahme von *nsp2-1* und *nsp2-2* der Charge 1, beobachtet. Somit war der Gehalt an Abbauprodukten in Homogenaten gelagerter Samen deutlich niedriger als in Homogenaten frischer Samen.

### 4.1.5. Glucosinolat-Abbauprodukte in Keimlingen des Wildtyps

Um zu untersuchen, welche Typen von Glucosinolat-Abbauprodukten Keimlinge von *A. thaliana* Col-0 bei Gewebezzerstörung bilden, wurden wässrige Homogenate der Keimlinge hergestellt und die gebildeten Produkte der Glucosinolat-Hydrolyse qualitativ und quantitativ erfasst. Das Profil der Glucosinolat-Abbauprodukte wurde mit dem Glucosinolatprofil der Keimlinge (Abb. 10) verglichen, um eine Aussage über die Wiederfindung der Abbauprodukte zu machen.



**Abbildung 10: Profil der Glucosinolate in Keimlingen von *A. thaliana* Col-0.** Gezeigt ist ein HPLC-Chromatogramm der Desulfoglucosinolate. Die Retentionszeiten und Seitenketten der Desulfoglucosinolate sind angegeben. Die Keimlinge wurden im Zweiblattstadium analysiert. IS, interner Standard.

In früheren Untersuchungen wurden die Profile der Glucosinolate in Keimlingen von *A. thaliana* Col-0 mehrfach bestimmt [Petersen et al., 2002; Dörr, 2014]. Die Bestimmung der Glucosinolate erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nur bestätigend und stichprobenartig (Tab.

A16). Unterschiede zu früheren Untersuchungen traten im Gehalt des 4BZO-Glucosinolats auf, da im Rahmen dieser Arbeit mit einem RF von 0,7 gerechnet wurde [Reichelt et al., 2002], in einer früheren Arbeit mit einem RF von 2,0 [Dörr, 2014].

Im wässrigen Homogenat von Keimlingen des Wildtyps wurden folgende Glucosinolat-Abbauprodukte detektiert: Das Nitril und das Isothiocyanat des 4MSOB- und 4MTB-Glucosinolats sowie das Nitril des 3MSOP-, 5MTP-, 7MTH-, 8MTO-, 3BZO- und 4BZO-Glucosinolats (Abb. 12C, 13C, Tab. 19). Die größten Mengen an Abbauprodukten wurden für das aliphatische 4MTB-Glucosinolat gefunden (Abb. 12C). Obwohl I3M-Glucosinolat das Hauptglucosinolat in Keimlingen ist und weitere Indol-Glucosinolate vorkommen [Dörr, 2014], wurden nur geringe Mengen des Nitrils des I3M-Glucosinolats detektiert (Tab. 19). Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden, GC-MS und GC-FID, sind nicht geeignet Isothiocyanate der Indol-Glucosinolate und die daraus entstehenden Abbauprodukte nachzuweisen. Daher lag der Fokus auf den Abbauprodukten aliphatischer Glucosinolate.

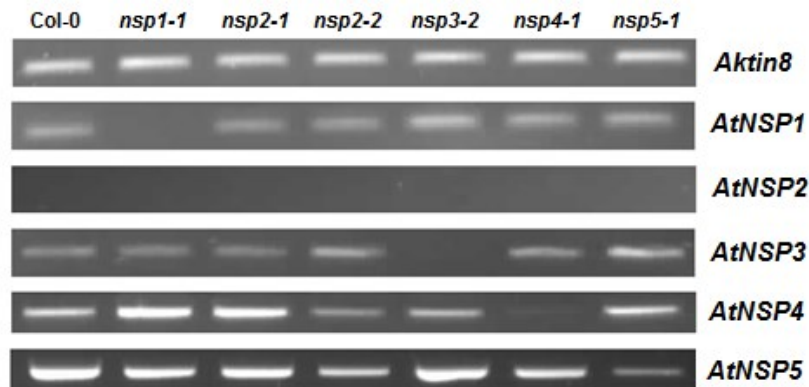
4MTB- und 4MSOB-Glucosinolat wurden im Homogenat des Wildtyps vorwiegend zum Nitril abgebaut (> 90 % Nitril, < 10 % Isothiocyanat) (Abb. 12C, 13C). Für 7MTH-, 8MTO- und 4BZO-Glucosinolat wurde im Homogenat des Wildtyps vorwiegend das Nitril detektiert (Tab. 19). Das Nitril des 3MSOP-, 5MTP- und 3BZO-Glucosinolats wurde in niedrigen Mengen im Homogenat des Wildtyps detektiert (Tab.19). Es zeigte sich also, dass die Keimlinge bei Gewebeerstörung vorwiegend Nitrile (> 90 %) und kaum Isothiocyanate bilden.

Um zu überprüfen, ob der Glucosinolatabbau in wässrigen Homogenaten der Keimlinge vollständig abläuft, wurde der Gehalt an intaktem Glucosinolat im wässrigen Homogenat bestimmt. Rund 50% des I3M-Glucosinolats wurde nicht hydrolysiert und war nach Abbau noch im wässrigen Homogenat des Wildtyps detektierbar (Abb. A1). Alle anderen Glucosinolate wurden im wässrigen Homogenat des Wildtyps nicht nachgewiesen, sie wurden also vollständig abgebaut. Beim Vergleich der absoluten Menge der im Homogenat enthaltenen Abbauprodukte des 4MTB-Glucosinolats mit dem 4MTB-Glucosinolatgehalt der Keimlinge fiel auf, dass der Gehalt an Abbauprodukten rund viermal höher war als der Glucosinolatgehalt der Keimlinge (Abb. 12). Die Wiederfindung der 4MTB-Glucosinolat-Abbauprodukte scheint nicht limitierend zu sein, jedoch gibt es keine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem Glucosinolatgehalt und dem Gehalt der Abbauprodukte. Der Gehalt der 4MSOB-Glucosinolat-Abbauprodukte war im Homogenat des Wildtyps niedriger als der 4MSOB-Glucosinolatgehalt der Keimlinge (Abb. 13), die Wiederfindung der Abbauprodukte des 4MSOB-Glucosinolats in Keimlingen lag bei rund 65%. Für alle anderen Abbauprodukte konnte keine Aussage über die Wiederfindung getroffen werden, da die Detektion der Abbauprodukte in wässrigen Homogenaten nicht reproduzierbar war. In den folgenden Analysen sollte der Fokus daher nur auf den Abbau von 4MTB- und 4MSOB-Glucosinolat gelegt werden.

#### **4.1.6. Expression von *AtNSP1-AtNSP5* in Keimlingen des Wildtyps und der T-DNA-Mutanten**

Um zu ermitteln, welche *AtNSPs* in Keimlingen exprimiert werden und daraus folgend für die Nitrilbildung bei Glucosinolatabbau verantwortlich sein könnten, wurde die Expression der *AtNSPs* im Wildtyp bestimmt. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus Keimlingen für die semiquantitative RT-PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt. *Aktin8* diente in der

Transkriptanalyse als Kontrolle. Die PCR-Bande für *Aktin8* wurde im Wildtyp und in den untersuchten T-DNA-Mutanten in vergleichbarer Intensität detektiert (Abb. 11). Es zeigte sich, dass in Keimlingen des Wildtyps *AtNSP1*, *AtNSP3*, *AtNSP4* und *AtNSP5* exprimiert wurden, jedoch nicht *AtNSP2* (Abb. 11). Um zu überprüfen, ob die T-DNA-Insertion in *AtNSP1-AtNSP5* zu einer Ausschaltung der Gene führte, wurde parallel die Expression von *AtNSP1-AtNSP5* in Keimlingen der T-DNA-Mutanten analysiert. Das *AtNSP1*-Transkript war in *nsp1-1* nicht mehr nachweisbar (Abb. 11). Somit handelte es bei *nsp1-1* um eine Knock-out-Mutante. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*) hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression von *AtNSP3* und *AtNSP5* und einen geringen Einfluss auf die von *AtNSP4* (Abb. 11). *AtNSP2* wurde weder im Wildtyp noch in den untersuchten T-DNA-Mutanten exprimiert (Abb. 11). Eine T-DNA-Insertion in *AtNSP2* wirkte sich jedoch augenscheinlich auf die Expression von *AtNSP3-AtNSP5* aus: In *nsp2-1* war die PCR-Bande für *AtNSP4* etwas stärker als im Wildtyp (Abb. 11). In *nsp2-2* war die PCR-Bande für *AtNSP3* etwas stärker, die für *AtNSP4* und *AtNSP5* etwas schwächer als im Wildtyp (Abb. 11). Diese kleinen Unterschiede waren nur teilweise reproduzierbar. Das *AtNSP3*-Transkript war in *nsp3-2* nicht mehr nachweisbar (Abb. 11). Somit handelte es bei *nsp3-2* um eine Knock-out-Mutante. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP3* (*nsp3-2*) hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression von *AtNSP1*, *AtNSP4* und *AtNSP5* (Abb. 11). Das *AtNSP4*-Transkript war in *nsp4-1* nachweisbar, aber in nur sehr geringen Mengen (Abb. 11). Somit wirkte sich die T-DNA-Insertion in *AtNSP4* (*nsp4-1*) auf das Transkriptionsniveau von *AtNSP4* aus. Die Mutation hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression von *AtNSP1*, *AtNSP3* und *AtNSP5*. Die Expression des *AtNSP5*-Transkripts in *nsp5-1* war gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 11). Somit wirkte sich die T-DNA-Insertion in *AtNSP5* (*nsp5-1*) auf das Transkriptionsniveau von *AtNSP5* aus. In *nsp5-1* war die Expression von *AtNSP3* etwas stärker als im Wildtyp (Abb. 11). Dieser Unterschied war jedoch nicht reproduzierbar.



**Abbildung 11: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der *AtNSP1-AtNSP5*-Expression in *A. thaliana*-Keimlingen.** Die Gesamt-RNA aus dreizehn bis fünfzehn Tage alten Keimlingen des Wildtyps und verschiedener T-DNA-Mutanten wurde für die cDNA-Synthese verwendet. PCR-Ansätze mit genspezifischen Primern wurden mittels Gelelektrophorese getrennt. *Aktin8* diente als Kontrolle. Dargestellt sind die mit Midori Green Advance Stain-gefärbten Agarosegele. Eine zweite Bestimmung mit unabhängig kultivierten Keimlingen führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung der Produkte wurde die Amplifizierung der Ziel-cDNA bestätigt und eine Amplifikation anderer cDNA ausgeschlossen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in *nsp1-1* und *nsp3-2* das Zielgen ausgeschaltet ist, während in *nsp4-1* und *nsp5-1* die Expression des Zielgens reduziert ist. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*) beeinflusste zusätzlich die Expression von *AtNSP4*.

#### 4.1.7. Glucosinolat-Abbauprodukte in Keimlingen der T-DNA-Mutanten

Um zu untersuchen, ob die T-DNA-Insertion in *AtNSP1-AtNSP5* einen Einfluss auf die Bildung der Glucosinolat-Abbauprodukte in Homogenaten der Keimlinge hat, wurden die Abbauprodukte der aliphatischen Glucosinolate 4MTB- und 4MSOB-Glucosinolat in wässrigen Homogenaten der T-DNA-Mutanten mit den wässrigen Homogenaten des Wildtyps und der T-DNA-Mutanten anderer *AtNSP*-Gene verglichen. In Homogenaten der T-DNA-Mutanten, mit Ausnahme von *nsp1-1*, wurde wie im Homogenat des Wildtyps viel Nitril und wenig Isothiocyanat des 4MTB-Glucosinolats detektiert (Abb. 12C). Im Homogenat der Keimlinge von *nsp1-1* hingegen machte das Isothiocyanat des 4MTB-Glucosinolats 92 % der Gesamtmenge der 4MTB-Glucosinolat-Abbauprodukte aus, das dazugehörige Nitril 8 %. Der Gehalt an Nitril des 4MTB-Glucosinolats im Homogenat von *nsp1-1* war signifikant geringer, der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat signifikant höher als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 12C). Insgesamt war der Gehalt an Abbauprodukten des 4MTB-Glucosinolats im Homogenat von *nsp1-1* im Mittel deutlich niedriger als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 12C). Der Gehalt an 4MTB-Glucosinolat in Keimlingen wurde durch die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* jedoch nicht beeinflusst (Abb. 12A, B). Die geringe Menge detektierter Abbauprodukte könnte die Folge eines unvollständigen Abbaus oder der schlechten analytischen Wiederfindung des Isothiocyanats des 4MTB-Glucosinolats aufgrund seiner Reaktivität sein. Da wie im Homogenat des Wildtyps im Homogenat von *nsp1-1* kein intaktes 4MTB-Glucosinolat gefunden wurde, ist eine schlechte Wiederfindung des Isothiocyanats des 4MTB-Glucosinolats die wahrscheinlichere Ursache. Im Homogenat von *nsp2-1* war der Gehalt des Nitrils des 4MTB-Glucosinolats im Mittel etwas niedriger als im Homogenat des Wildtyps, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 12C). In Homogenaten von *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* war der Gehalt an Nitril des 4MTB-Glucosinolats signifikant kleiner als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 12C). Der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat in Homogenaten von *nsp2-1*, *nsp3-2* und *nsp5-1* unterschied sich nicht signifikant vom Gehalt im Homogenat des Wildtyps (Abb. 12C). Im Homogenat von *nsp4-1* war der Gehalt an Isothiocyanat des 4MTB-Glucosinolats signifikant geringer als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 12C). Insgesamt wurde also festgestellt, dass die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*), *AtNSP3* (*nsp3-2*), *AtNSP4* (*nsp4-1*) bzw. *AtNSP5* (*nsp5-1*) einen Einfluss auf die Art und Menge der aus 4MTB-Glucosinolat gebildeten Abbauprodukte hat: In Homogenaten der Keimlinge von *nsp1-1*, *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* wurden signifikant geringere Mengen des Nitrils des 4MTB-Glucosinolats gebildet, wobei *nsp1-1* die stärkste Reduktion des Nitrilgehalts verursachte.

In Homogenaten der T-DNA-Mutanten, mit Ausnahme von *nsp1-1*, wurden wie im Homogenat des Wildtyps viel Nitril und wenig Isothiocyanat des 4MSOB-Glucosinolats detektiert (Abb. 13C). Im Homogenat der Keimlinge von *nsp1-1* hingegen machte das Isothiocyanat des 4MSOB-Glucosinolats 94 % der Gesamtmenge der 4MSOB-Glucosinolat-Abbauprodukte aus, das dazugehörige Nitril 6 %. Der Gehalt an Nitril des 4MSOB-Glucosinolats im Homogenat von *nsp1-1* war signifikant geringer, der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat signifikant höher als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 13C). Insgesamt war der Gehalt an Abbauprodukten des 4MSOB-Glucosinolats im Homogenat von *nsp1-1* im Mittel nur rund halb so groß wie im Homogenat des Wildtyps (Abb. 13C). Der Gehalt an 4MSOB-Glucosinolat in Keimlingen wurde durch die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*) jedoch nicht beeinflusst (Abb. 13A, B). Die geringe Menge detektierter Abbauprodukte könnte die Folge eines unvollständigen Abbaus oder der schlechten analytischen Wiederfindung des Isothiocyanats des 4MSOB-Glucosinolats

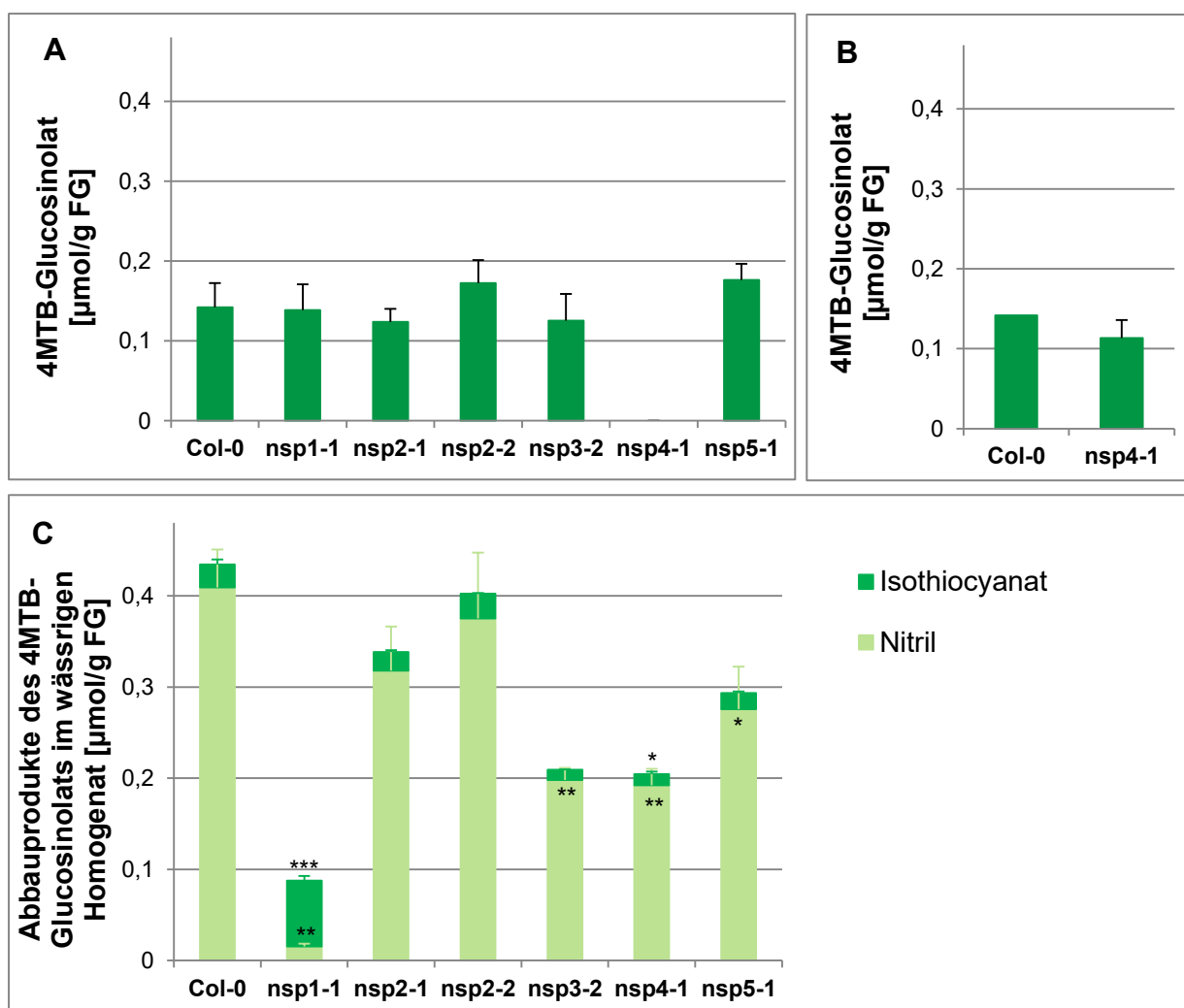
aufgrund seiner Reaktivität sein. Da wie im Homogenat des Wildtyps im Homogenat von *nsp1-1* kein intaktes 4MSOB-Glucosinolat gefunden wurde, ist eine schlechte Wiederfindung des Isothiocyanats des 4MSOB-Glucosinolats die wahrscheinlichere Ursache. In Homogenaten von *nsp2-1* und *nsp2-2* war der Gehalt des Nitrils des 4MSOB-Glucosinolats im Mittel etwas niedriger als im Homogenat des Wildtyps, diese Unterschiede waren aber nicht signifikant (Abb. 13C). In Homogenaten von *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* war der Gehalt an Nitril des 4MSOB-Glucosinolats signifikant geringer als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 13C). Der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat in Homogenaten von *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* unterschied sich nicht signifikant vom Gehalt im Homogenat des Wildtyps (Abb. 13C). Insgesamt wurde also festgestellt, dass die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*), *AtNSP3* (*nsp3-2*), *AtNSP4* (*nsp4-1*) bzw. *AtNSP5* (*nsp5-1*) einen Einfluss auf die Art und Menge der aus 4MSOB-Glucosinolat gebildeten Abbauprodukte hat. In Homogenaten der Keimlinge von *nsp1-1*, *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* wurden signifikant geringere Mengen des Nitrils des 4MSOB-Glucosinolats gebildet, wobei *nsp1-1* die stärkste Reduktion des Nitrilgehalts verursachte.

Die für den Abbau des 4MTB- und 4MSOB-Glucosinolats gefundenen Ergebnisse ließen sich prinzipiell auch für den Abbau der anderen Glucosinolate zeigen (Tab. 19). Im Homogenat der Keimlinge von *nsp1-1* wurden keine oder nur sehr geringe Mengen der Nitrile von 3MSOP-, 5MTP-, 7MTH-, 8MTO-, 3BZO-, 4BZO- und I3M-Glucosinolat detektiert (Tab. 19). Wie in 4.1.5. beschrieben, war die Detektion der Abbauprodukte der Nebenglucosinolate in wässrigen Homogenaten nicht reproduzierbar. Dies erschwerte die Interpretation der für den Abbau der Nebenglucosinolate erhaltenen Daten. Schlussfolgerungen über die Rolle von *AtNSP1*-*AtNSP5* für die Nitrilbildung in Keimlingen sollten daher nur auf Basis der aliphatischen Glucosinolate, 4MTB- und 4MSOB-Glucosinolat, gezogen werden.

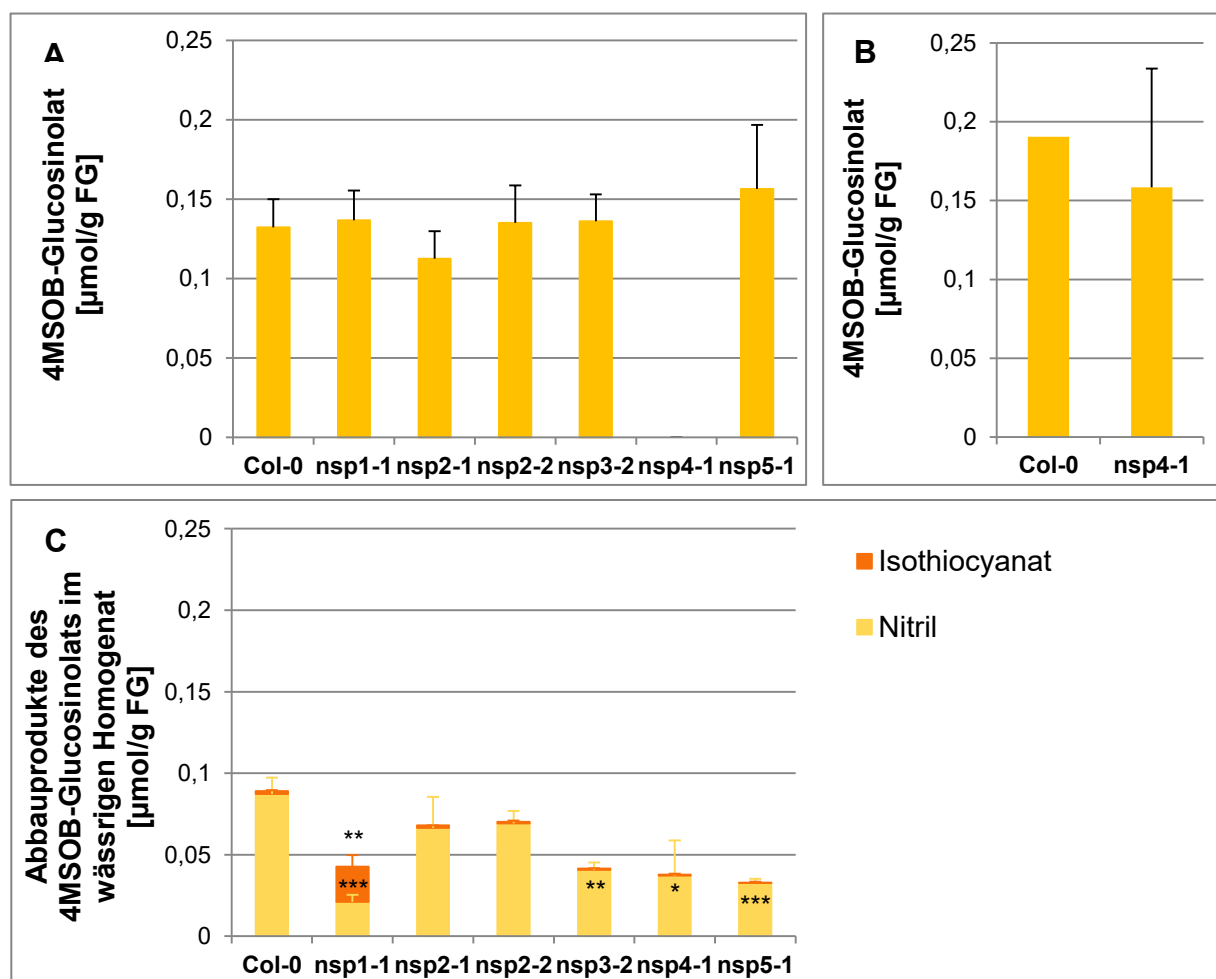
Anhand der Daten früherer Untersuchungen [Dörr, 2014] und der vorliegenden Arbeit (Tab. A16) wurde auch geprüft, ob die T-DNA-Insertion in *AtNSP1*-*AtNSP5* einen Einfluss auf den Glucosinolatgehalt der Keimlinge hat. Es wurden jedoch keine Unterschiede im Glucosinolatgehalt gefunden, die die Veränderungen im Gehalt der Abbauprodukte erklären könnten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Homogenat des Wildtyps generell fast ausschließlich Nitril detektiert wurde. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*) führte zu einer Reduktion des Nitrilgehalts in wässrigen Homogenaten der Keimlinge relativ zum Wildtyp. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP1* (*nsp1-1*) beeinträchtigte damit die Fähigkeit zur Nitrilbildung in Homogenaten der Keimlinge. Somit ist *AtNSP1* in Keimlingen für die Nitrilbildung verantwortlich. Da im wässrigen Homogenat von *nsp1-1* noch Nitrile detektiert wurden, scheinen neben *AtNSP1* weitere *AtNSPs* an der Nitrilbildung in Keimlingen beteiligt zu sein. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP3* (*nsp3-2*), *AtNSP4* (*nsp4-1*) bzw. *AtNSP5* (*nsp5-1*) führte zur signifikanten Abnahme an Nitril des 4MTB- und 4MSOB-Glucosinolats in Homogenaten der Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp, jedoch nicht zu einem Anstieg an korrespondierendem Isothiocyanat. Vermutlich tragen diese *AtNSPs* ebenfalls zur Nitrilbildung in Keimlingen bei.





**Abbildung 12: Abbau von 4MTB-Glucosinolat in Homogenaten der Keimlinge von *A. thaliana*.** Der Glucosinolatgehalt wurde über Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt (A, B). Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert (C). Die Keimlinge wurden im Zweiblattstadium analysiert. Dargestellt wurde der MW  $\pm$  SD in  $\mu\text{mol/g}$  Frischgewicht (FG)  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängig kultivierten Keimlingschargen. Die Daten aus Abbildung A stammen aus Dörr, 2014. Abbildung B stellt einen separaten Versuch dar. Das FG der Keimlinge wurde für sechs Chargen direkt nach der Ernte bestimmt. Das TG derselben Chargen wurde nach dem Lyophilisieren bestimmt. Das Verhältnis FG/TG liegt bei  $18,6 \pm 0,6$  ermittelt aus  $n = 6$  unabhängig geernteten Keimlingschargen. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , t-Test.



**Abbildung 13: Abbau von 4MSOB-Glucosinolat in Homogenaten der Keimlinge von *A. thaliana*.** Der Glucosinolatgehalt wurde über Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt (A, B). Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert (C). Die Keimlinge wurden im Zweiblattstadium analysiert. Dargestellt wurde der MW  $\pm$  SD in  $\mu\text{mol/g FG}$  aus  $n = 3$  unabhängig kultivierten Keimlingschargen. Die Daten aus Abbildung A stammen aus Dörr, 2014. Abbildung B stellt einen separaten Versuch dar. Das FG der Keimlinge wurde für sechs Chargen direkt nach der Ernte bestimmt. Das TG derselben Chargen wurde nach dem Lyophilisieren bestimmt. Das Verhältnis FG/TG liegt bei  $18,6 \pm 0,6$  ermittelt aus  $n = 6$  unabhängig geernteten Keimlingschargen. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , t-Test.

**Tabelle 19: Abbau der Nebenglucosinolate in Homogenaten der Keimlinge von *A. thaliana*.** Die Abbauprodukte der Nebenglucosinolate, Nitril und Isothiocyanat, im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Die Keimlinge wurden im Zweiblattstadium analysiert. Angegeben wurde der MW  $\pm$  SD in  $\mu\text{mol/g}$  FG aus  $n = 3$  unabhängig kultivierten Keimlingschargen. # Signifikanztest nicht anwendbar.

	3MSOP-CN	3MSOP-NCS	5MTP-CN	5MTP-NCS
<b>Col-0</b>	0,01 $\pm$ 0,002	0 #	0,02 $\pm$ 0,002	0 #
<b>nsp1-1</b>	0,001 $\pm$ 0,002	0,002 $\pm$ 0,0002	0 #	0,002 $\pm$ 0,0002
<b>nsp2-1</b>	0,008 $\pm$ 0,003	0 #	0,02 $\pm$ 0,004	0 #
<b>nsp2-2</b>	0,007 $\pm$ 0,001	0 #	0,02 $\pm$ 0,01	0 #
<b>nsp3-2</b>	0,004 $\pm$ 0,0004	0 #	0,01 $\pm$ 0,001	0 #
<b>nsp4-1</b>	0,004 $\pm$ 0,004	0 #	0,01 $\pm$ 0,002	0 #
<b>nsp5-1</b>	0,001 $\pm$ 0,002	0 #	0,02 $\pm$ 0,004	0 #

	7MTH-CN	8MTO-CN	3BZO-CN
<b>Col-0</b>	0,01 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,002	0,003 $\pm$ 0,0004
<b>nsp1-1</b>	0 #	0 #	0 #
<b>nsp2-1</b>	0,01 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,001	0,002 $\pm$ 0,0002
<b>nsp2-2</b>	0,01 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,0003	0,003 $\pm$ 0,0003
<b>nsp3-2</b>	0,01 $\pm$ 0,001	0,002 $\pm$ 0,001	0,002 $\pm$ 0,0004
<b>nsp4-1</b>	0,01 $\pm$ 0,001	0,002 $\pm$ 0,001	0,001 $\pm$ 0,001
<b>nsp5-1</b>	0,01 $\pm$ 0,002	0,002 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,001

	4BZO-CN	4OHB-NCS	I3M-CN
<b>Col-0</b>	0,006 $\pm$ 0,0004	0 #	0,01 $\pm$ 0,0004
<b>nsp1-1</b>	0,0001 $\pm$ 0,0002	0,03 $\pm$ 0,01	0 #
<b>nsp2-1</b>	0,004 $\pm$ 0,001	0 #	0,004 $\pm$ 0,001
<b>nsp2-2</b>	0,005 $\pm$ 0,0003	0 #	0,004 $\pm$ 0,002
<b>nsp3-2</b>	0,006 $\pm$ 0,001	0 #	0,003 $\pm$ 0,0002
<b>nsp4-1</b>	0,005 $\pm$ 0,001	0 #	0,005 $\pm$ 0,002
<b>nsp5-1</b>	0,003 $\pm$ 0,001	0 #	0,003 $\pm$ 0,001

## 4.2. Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation spezifizierender Proteine und ihrer Homologe

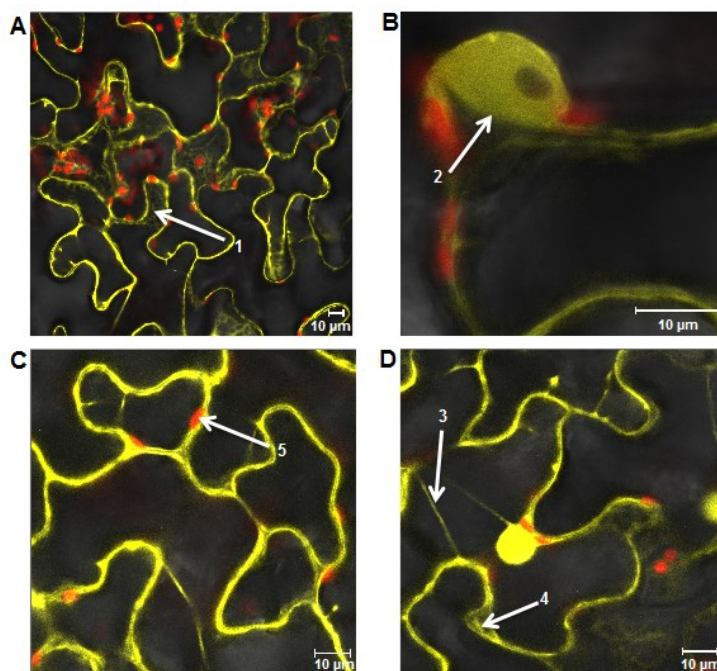
### 4.2.1. Subzelluläre Lokalisation von AtNSP1

Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle AtNSP1 vorkommt, wurden die Expressionskonstrukte pExp\_atnsp1-venus und pExp\_venus-atnsp1 zur Produktion von AtNSP1 in Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors erstellt. Bei dem Fluoreszenzprotein Venus handelt es sich um eine durch Mutation entstandene Variante des YFP [Nagai et al., 2002]. Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit den Expressionskonstrukten mittels *R. radiobacter*-Infiltration transformiert. Drei bis vier Tage nach der Transformation wurde die Fluoreszenz in der unteren Epidermis von Blattscheiben ausgewertet.

Für AtNSP1-Venus zeigte sich eine gleichmäßige mittelschwache bis mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 14A, B). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 14A). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie vergleichbar intensiv wie im

Inneren des Zellkerns (Abb. 14B). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse. Für Venus-AtNSP1 zeigte sich eine gleichmäßige mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 14C, D). Zahlreiche fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 14C, D). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie vergleichbar intensiv wie im Inneren des Zellkerns (Abb. 14D). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse lassen auf eine cytosolische Lokalisation der Fusionsproteine schließen. Es spielte keine Rolle, ob das Fluoreszenzprotein Venus am N- oder C-Terminus von AtNSP1 fusioniert war. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei AtNSP1 um ein cytosolisches Protein handelt. Da die Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns vergleichbar intensiv war wie die Fluoreszenz in der Kernperipherie, zeigten die Ergebnisse an, dass AtNSP1 kerngängig ist, jedoch nicht kernlokalisiert.



**Abbildung 14: Subzelluläre Lokalisation von AtNSP1 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Drei bis vier Tage nach der Transformation von *N. benthamiana* wurden cLSM-Aufnahmen im Channel-Modus bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Variationen in der Fluoreszenz kamen durch unterschiedlich starke Expression oder durch Veränderungen der Einstellungen bei Bildaufnahme zustande. A, B: AtNSP1-Venus. C, D: Venus-AtNSP1. 1: Ausgesparte Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen; 2: Zellkern; 3: Cytoplasmastrang; 4: Ausgesparte Zellwände; 5: Chloroplasten.

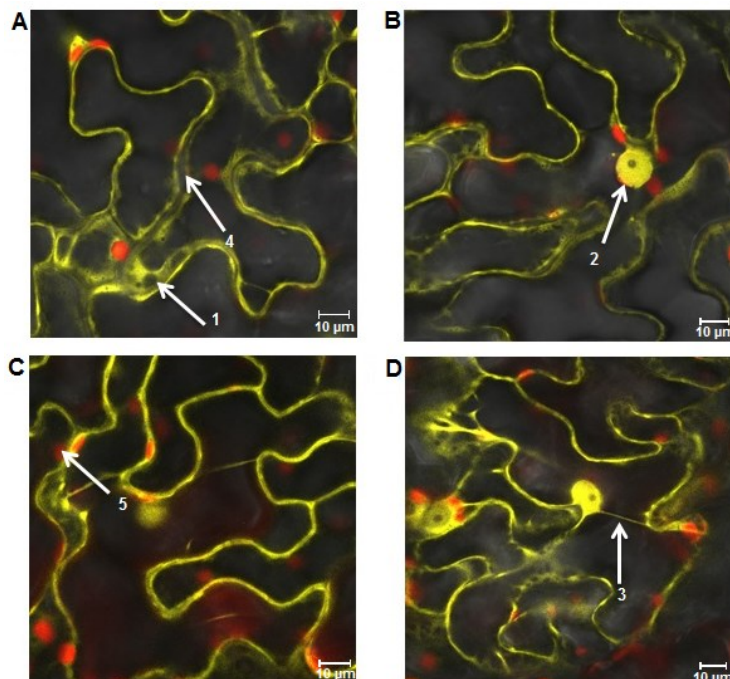
### 4.2.2. Subzelluläre Lokalisation von AtNSP2

Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle AtNSP2 vorkommt, wurden die Expressionskonstrukte pExp\_*atnsp2-venus* und pExp\_*venus-atnsp2* zur Produktion von AtNSP2 in Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors erstellt. Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit den Expressionskonstrukten mittels *R. radiobacter*-Infiltration transformiert. Drei bis vier Tage nach der Transformation wurde die Fluoreszenz in der unteren Epidermis von Blattscheiben ausgewertet.

Für AtNSP2-Venus zeigte sich eine gleichmäßige mittelschwache bis mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Zellperipherie der Epidermiszellen (Abb. 15A, B). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 15A). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie vergleichbar intensiv wie im Inneren des Zellkerns (Abb. 15B). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte

vergleichbare Ergebnisse. Für Venus-AtNSP2 zeigte sich eine gleichmäßige mittelschwache bis mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 15C, D). Zahlreiche fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 15C, D). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie vergleichbar intensiv wie im Inneren des Zellkerns (Abb. 15D). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse lassen auf eine cytosolische Lokalisation der Fusionsproteine schließen. Es spielte keine Rolle, ob das Fluoreszenzprotein Venus am N- oder C-Terminus von AtNSP2 fusioniert war. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei AtNSP2 um ein cytosolisches Protein handelt. Da die Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns vergleichbar intensiv war wie die Fluoreszenz in der Kernperipherie, zeigten die Ergebnisse an, dass AtNSP2 kerngängig ist, jedoch nicht kernlokalisiert.



**Abbildung 15: Subzelluläre Lokalisation von AtNSP2 nach Produktion in *N. benthamiana*.**

Drei bis vier Tage nach der Transformation von *N. benthamiana* wurden cLSM-Aufnahmen im Channel-Modus bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Variationen in der Fluoreszenz kamen durch unterschiedlich starke Expression oder durch Veränderungen der Einstellungen bei Bildaufnahme zustande. A, B: AtNSP2-Venus. C, D: Venus-AtNSP2. 1: Ausgesparte Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen; 2: Zellkern; 3: Cytoplasmastrang; 4: Ausgesparte Zellwände; 5: Chloroplasten.

### 4.2.3. Subzelluläre Lokalisation von AtNSP4

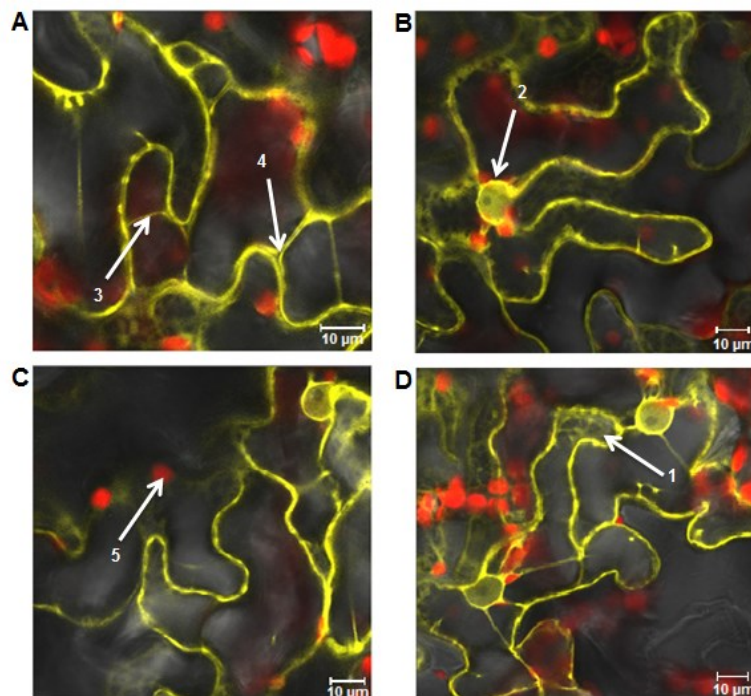
Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle AtNSP4 vorkommt, wurden die Expressionskonstrukte pExp\_*atnsp4-venus* und pExp\_*venus-atnsp4* zur Produktion von AtNSP4 in Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors erstellt. Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit den Expressionskonstrukten mittels *R. radiobacter*-Infiltration transformiert. Drei bis vier Tage nach der Transformation wurde die Fluoreszenz in der unteren Epidermis von Blattscheiben ausgewertet.

Für AtNSP4-Venus zeigte sich eine relativ gleichmäßige mittelschwache bis mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 16A, B). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 16A). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie etwas intensiver als im Inneren des Zellkerns (Abb. 16B). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.



Für Venus-AtnSP4 zeigte sich eine relativ gleichmäßige mittelschwache bis mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 16C, D). Zahlreiche fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 16D). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie etwas intensiver als im Inneren des Zellkerns (Abb. 16C, D). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse lassen auf eine cytosolische Lokalisation der Fusionsproteine schließen. Es spielte keine Rolle, ob das Fluoreszenzprotein Venus am N- oder C-Terminus von AtNSP4 fusioniert war. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei AtNSP4 um ein cytosolisches Protein handelt. Da die Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns schwächer war als die Fluoreszenz in der Kernperipherie, zeigten die Ergebnisse an, dass AtNSP4 kerngängig ist, jedoch nicht kernlokalisiert.



**Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation von AtNSP4 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Drei bis vier Tage nach der Transformation von *N. benthamiana* wurden cLSM-Aufnahmen im Channel-Modus bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Variationen in der Fluoreszenz kamen durch unterschiedlich starke Expression oder durch Veränderungen der Einstellungen bei Bildaufnahme zustande. A, B: AtNSP4-Venus. C, D: Venus-AtNSP4. 1: Ausgesparte Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen; 2: Zellkern; 3: Cytoplasmastrang; 4: Ausgesparte Zellwände; 5: Chloroplasten.

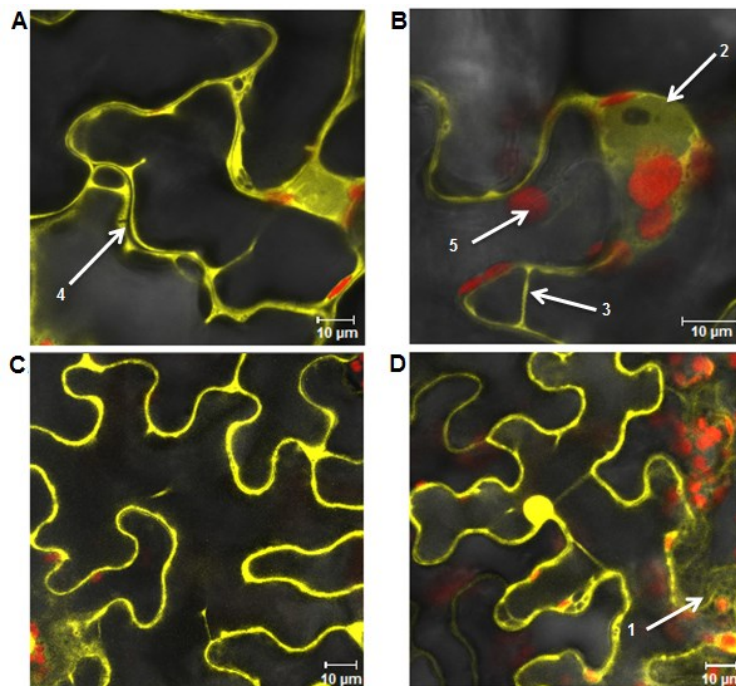
#### 4.2.4. Subzelluläre Lokalisation von AtNSP5

Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle AtNSP5 vorkommt, wurden die Expressionskonstrukte pExp\_*atnsp5-venus* und pExp\_*venus-atnsp5* zur Produktion von AtNSP5 in Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors erstellt. Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit den Expressionskonstrukten mittels *R. radiobacter*-Infiltration transformiert. Drei bis vier Tage nach der Transformation wurde die Fluoreszenz in der unteren Epidermis von Blattscheiben ausgewertet.

Für AtNSP5-Venus zeigte sich eine gleichmäßige mittelschwache bis mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 17A, B). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 17A, B). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie etwas intensiver als im Inneren des Zellkerns (Abb. 17B). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse. Für Venus-AtNSP5 zeigte sich eine gleichmäßige mittelstarke

gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 17C, D). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 17D). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie vergleichbar intensiv wie im Inneren des Zellkerns (Abb. 17D). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse lassen auf eine cytosolische Lokalisation der Fusionsproteine schließen. Es spielte keine Rolle, ob das Fluoreszenzprotein Venus am N- oder C-Terminus von AtNSP5 fusioniert war. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei AtNSP5 um ein cytosolisches Protein handelt. Da die Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns etwas schwächer oder vergleichbar intensiv war wie die Fluoreszenz in der Kernperipherie, zeigten die Ergebnisse an, dass AtNSP5 kerngängig ist, jedoch nicht kernlokalisiert.



**Abbildung 17: Subzelluläre Lokalisation von AtNSP5 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Drei bis vier Tage nach der Transformation von *N. benthamiana* wurden cLSM-Aufnahmen im Channel-Modus bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Variationen in der Fluoreszenz kamen durch unterschiedlich starke Expression oder durch Veränderungen der Einstellungen bei Bildaufnahme zustande. A, B: AtNSP5-Venus. C, D: Venus-AtNSP5. 1: Ausgesparte Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen; 2: Zellkern; 3: Cytoplasmastrang; 4: Ausgesparte Zellwände; 5: Chloroplasten.

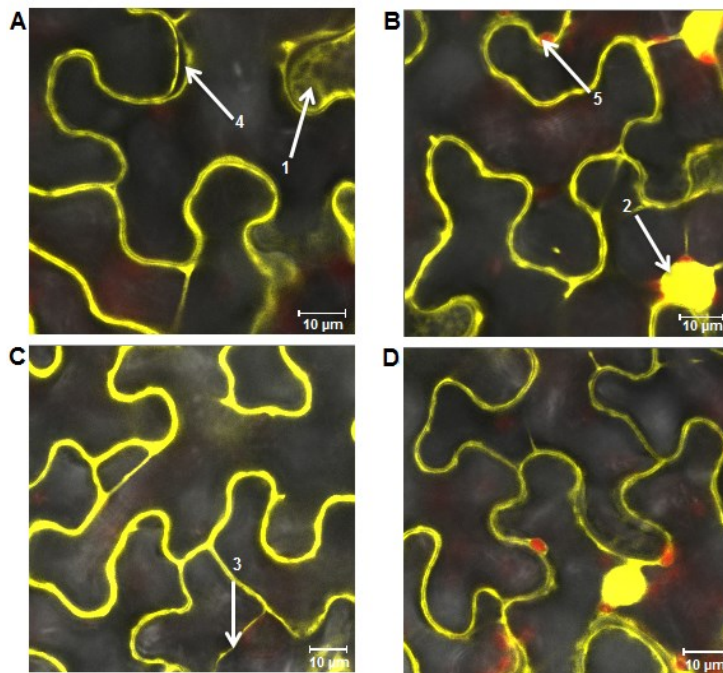
### 4.2.5. Subzelluläre Lokalisation von At3g07720

Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle At3g07720 vorkommt, wurden die Expressionskonstrukte pExp\_at3g07720-venus und pExp\_venus-at3g07720 zur Produktion von At3g07720 in Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors erstellt. Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit den Expressionskonstrukten mittels *R. radiobacter*-Infiltration transformiert. Drei bis vier Tage nach der Transformation wurde die Fluoreszenz in der unteren Epidermis von Blattscheiben ausgewertet.

Für At3g07720-Venus zeigte sich eine gleichmäßige mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 18A, B). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 18A, B). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie vergleichbar intensiv wie im Inneren des Zellkerns (Abb. 18B). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Für Venus-At3g07720 zeigte sich eine gleichmäßige mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 18C, D). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 18C). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie vergleichbar intensiv wie im Inneren des Zellkerns (Abb. 18D). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse lassen auf eine cytosolische Lokalisation der Fusionsproteine schließen. Es spielte keine Rolle, ob das Fluoreszenzprotein Venus am N- oder C-Terminus von At3g07720 fusioniert war. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei At3g07720 um ein cytosolisches Protein handelt. Da die Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns vergleichbar intensiv war wie die Fluoreszenz in der Kernperipherie, zeigten die Ergebnisse an, dass At3g07720 kerngängig ist, jedoch nicht kernlokalisiert.



**Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation von At3g07720 nach Produktion in *N. benthamiana*.**

Drei bis vier Tage nach der Transformation von *N. benthamiana* wurden cLSM-Aufnahmen im Channel-Modus bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Variationen in der Fluoreszenz kamen durch unterschiedlich starke Expression oder durch Veränderungen der Einstellungen bei Bildaufnahme zustande. A, B: At3g07720-Venus. C, D: Venus-At3g07720. 1: Ausgesparte Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen; 2: Zellkern; 3: Cytoplasmastrang; 4: Ausgesparte Zellwände; 5: Chloroplasten.

### 4.2.6. Subzelluläre Lokalisation von TaTFP

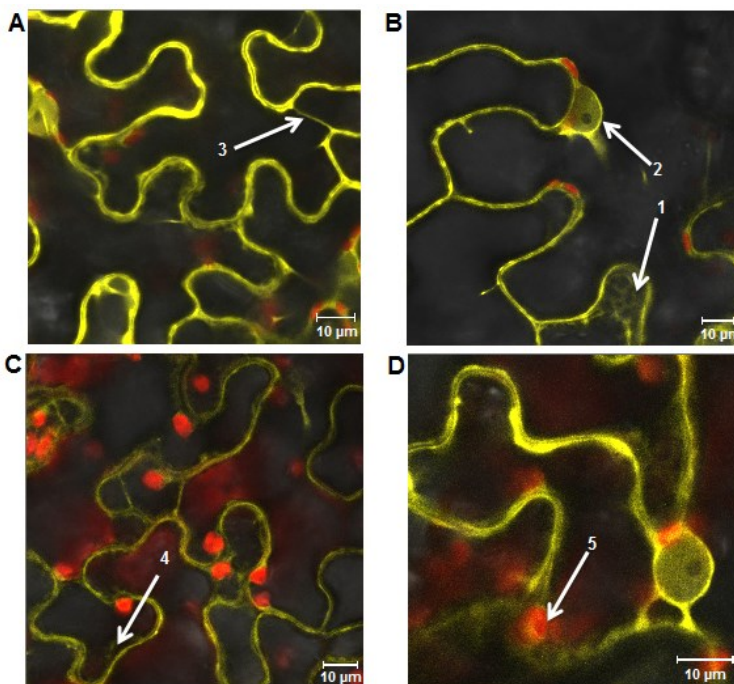
Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle TaTFP vorkommt, wurden die Expressionskonstrukte pExp\_*tatfp-venus* und pExp\_*venus-tatfp* zur Produktion von TaTFP in Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors erstellt. Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit den Expressionskonstrukten mittels *R. radiobacter*-Infiltration transformiert. Drei bis vier Tage nach der Transformation wurde die Fluoreszenz in der unteren Epidermis von Blattscheiben ausgewertet.

Für TaTFP-Venus zeigte sich eine gleichmäßige mittelschwache bis mittelstarke gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 19A, B). Einige fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 19A). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie etwas intensiver als im Inneren des Zellkerns (Abb. 19B). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse. Für Venus-TaTFP zeigte sich eine gleichmäßige schwache bis mittelschwache gelbe Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen (Abb. 19C, D). Einige



fluoreszierende Cytoplasmastränge wurden gefunden (Abb. 19C). Fluoreszierende Zellkerne waren ebenfalls sichtbar, dabei war die Fluoreszenz in der Kernperipherie etwas intensiver als im Inneren des Zellkerns (Abb. 19D). Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse lassen auf eine cytosolische Lokalisation der Fusionsproteine schließen. Es spielte keine Rolle, ob das Fluoreszenzprotein Venus am N- oder C-Terminus von TaTFP fusioniert war. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei TaTFP um ein cytosolisches Protein handelt. Da die Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns etwas schwächer war wie die Fluoreszenz in der Kernperipherie, zeigten die Ergebnisse an, dass TaTFP kerngängig ist, jedoch nicht kernlokalisiert.



**Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation von TaTFP nach Produktion in *N. benthamiana*.** Drei bis vier Tage nach der Transformation von *N. benthamiana* wurden cLSM-Aufnahmen im Channel-Modus bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Variationen in der Fluoreszenz kamen durch unterschiedlich starke Expression oder durch Veränderungen der Einstellungen bei Bildaufnahme zustande. A, B: TaTFP-Venus. C, D: Venus-TaTFP. 1: Ausgesparte Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen; 2: Zellkern; 3: Cytoplasmastrang; 4: Ausgesparte Zellwände; 5: Chloroplasten.

### 4.3. Untersuchungen zur Interaktion von TGG1 mit spezifizierenden Proteinen oder ihren Homologen

#### 4.3.1. Herangehensweise

Um zu untersuchen, ob TGG1 mit spezifizierenden Proteinen unter den in pflanzlichen Geweben vorherrschenden Bedingungen interagiert, wurden BiFC-Experimente mit in *N. benthamiana* produzierten Proteinen durchgeführt. Die Proteine waren mit den Reporter-Fragmente VYNE oder SCYCE fusioniert. Das Reporter-Fragment VYNE stellt den N-Terminus von Venus (Aminosäure 1-173) dar, das Reporter-Fragment SCYCE den C-Terminus von SCFP (Aminosäure 156-239) [Waadt et al., 2008; Gehl et al., 2009]. Die verwendete Kombination der beiden Reporter-Fragmente führt bei Rekonstitution des Fluoreszenzproteins zu einer Emission bei 515 nm [Waadt et al., 2008; Gehl et al., 2009]. Frühere Untersuchungen zeigten, dass TGG1 in C-terminaler Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus nicht im Cytosol, sondern in kleinen Vesikeln vorkommt [Gumz und Wittstock, unveröffentlichte Ergebnisse]. In N-terminaler Fusion mit Venus wurde das N-terminale Signalpeptid von TGG1 maskiert und das Fusionsprotein kam auf der cytosolischen Seite des ERs vor, bei hohem Expressionsniveau auch im Cytosol [Gumz und

Wittstock, unveröffentlichte Ergebnisse]. Wenn das Protein das ER und den Golgi-Apparat nicht passiert, bleibt es jedoch unglykosyliert, sodass es nicht dem natürlich vorkommenden Enzym entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Strategien verfolgt, um einen Nachweis der Interaktion zwischen TGG1 und spezifizierenden Proteinen mittels BiFC durchführen zu können. Zum einen wurden die Interaktionspartner in Blättern von *N. benthamiana* in verschiedenen Zellkompartimenten produziert und dann durch Zerstörung der Kompartimente infolge einer Extraktion zusammengebracht. Zum anderen wurden beide Interaktionspartner im gleichen Blatt produziert und die Interaktion zwischen cytosolischer, unglykosylierter TGG1-oSP und den spezifizierenden Proteinen im intakten Gewebe mittels BiFC untersucht. Damit TGG1 im Cytosol verbleibt, musste das Signalpeptid entfernt werden. Das Signalpeptid der Myrosinase TGG1 aus *A. thaliana* wird für die ersten neunzehn Aminosäuren vorhergesagt [Andersson et al., 2009]. Um die Lokalisation der veränderten Myrosinase (TGG1-oSP) zu überprüfen, wurde das Expressionskonstrukt pExp\_tgg1-osp-venus hergestellt und mittels *R. radiobacter* in Blätter von *N. benthamiana* infiltriert. Für TGG1-oSP-Venus wurde eine mittelstarke Fluoreszenz in der Peripherie der Epidermiszellen gefunden (Abb. A2). Die sichtbaren Cytoplasmastränge sprachen eindeutig dafür, dass es sich um ein cytosolisches Protein handelt (Abb. A2).

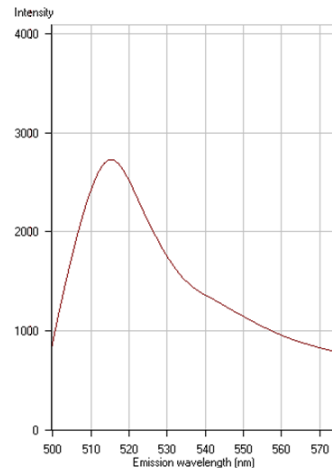
Für die Untersuchungen im intakten Gewebe wurde vier Tage nach der Infiltration die untere Epidermis der Blattscheiben mittels cLSM ausgewertet. Alle Aufnahmen erfolgten bei geringer Vergrößerung (10x), um möglichst große Bereiche der Blattscheiben beurteilen zu können und um einen Überblick über die Fluoreszenzintensität der Ansätze zu erhalten. Die Fluoreszenzintensität kann von Ausschnitt zu Ausschnitt stark schwanken. Dies kann durch Unterschiede im Expressionsniveau der Zellen oder durch eine unterschiedliche Anzahl der mittels *R. radiobacter* transformierten Zellen bedingt sein. Zu Beginn wurde die Fluoreszenzintensität in der ganzen ausgestanzten Blattscheibe visuell betrachtet. Anschließend wurden Aufnahmen von repräsentativen Ausschnitten angefertigt. Die Aufnahmen des Interaktionsansatzes wurden mit Aufnahmen der Negativkontrolle verglichen, um Differenzen in der Fluoreszenzintensität zu beurteilen. Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden neben der Negativkontrolle auch zwei Abundanzkontrollen in die Auswertung miteinbezogen.

### **4.3.2. Interaktion zwischen TGG1 bzw. TGG-oSP und AtNSP3**

#### **4.3.2.1. TGG1 und AtNSP3 in Blattextrakten**

Die Herstellung der Blattextrakte für die BiFC-Messung wurde mit Hilfe der Proteine Cnx6 und Cnx7 etabliert. Bei Cnx6 und Cnx7 handelt es sich um *A. thaliana*-Proteine, die in der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese eine Rolle spielen. Ihre Interaktion lässt sich in intakten Blattscheiben mittels BiFC gut nachweisen [Kaufholdt et al., 2013]. Nach getrennter Produktion von SCYCE-Cnx7 und Cnx6-VYNE in *N. benthamiana* wurden die Extrakte beider Proteine getrennt voneinander aufgearbeitet. Der Extraktionspuffer wurde mit dem Proteaseinhibitor PMSF versetzt, um einem möglichen Proteinabbau vorzubeugen. Die Extrakte wurden filtriert. Das Filtrat der Ultrafiltrationseinheit Vivaspin® Turbo mit einer Porengröße von 100 kDa wurde verwendet und über die Ultrafiltrationseinheit Vivaspin® mit einer Porengröße von 10 kDa weiter filtriert. Anschließend wurde der Überstand beider Extrakte vereinigt und über mehrere Stunden und/ oder über Nacht stehen gelassen. Die Aufarbeitungsmethode war erfolgreich und im Extrakt mit SCYCE-Cnx7 und Cnx6-VYNE

wurde ein Fluoreszenzmaximum bei 515 nm detektiert, das dem Maximum des BiFC-Komplexes entsprach (Abb. 20). Die parallel aufgearbeitete Negativkontrolle zeigte kein Maximum bei 515 nm (Abb. A3). Als Negativkontrolle wurde ein Extrakt mit CLuc-SCYCE und eqFP611-VYNE verwendet. CLuc ist der C-Terminus der Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* [Luker et al., 2004; Gehl et al., 2011]. Bei eqFP611 handelt es sich um ein rot fluoreszierendes Protein aus der Seenanemone *Entacmaea quadricolor* [Weidmann et al., 2002].



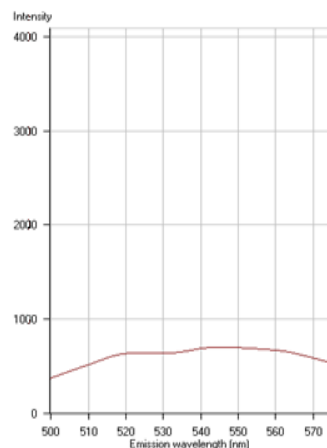
**Abbildung 20: BiFC nach getrennter Produktion von SCYCE-Cnx7 und Cnx6-VYNE in *N. benthamiana* und nachfolgender Extraktion.** Vier Tage nach der Infiltration wurden die Extrakte von SCYCE-Cnx7 und Cnx6-VYNE getrennt aufgearbeitet. Das vereinigte Extrakt wurde über Nacht bei 4°C gelagert und mit dem cLSM-510META ausgewertet.

Die Reproduktion des Ergebnisses war schwierig und führte letztlich nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Die Auswertung der Versuche wurde durch eine Hintergrundfluoreszenz im Bereich des Maximums des BiFC-Komplexes erschwert (Abb. A5A). Verschiedene Veränderungen in der Extraktaufarbeitung wurden durchgeführt. Zum einen wurden nur noch Ultrafiltrationseinheiten mit einer Porengröße von 10 kDa verwendet, um zu verhindern, dass Proteine bei der Filtration verloren gehen. Zum anderen wurde eine Ultrazentrifuge mit 101.727 x g verwendet, um Bestandteile, die die Hintergrundfluoreszenz verursachen, zu entfernen. Die Extrakte wurden zusätzlich mit PVPP versetzt, um zu versuchen, die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Auch ein Wechsel der Probenlagerung von 4°C auf RT wurde durchgeführt. Jedoch führten die Änderungen zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Trotz der unbefriedigenden Ergebnisse wurde getestet, ob sich die Interaktion zwischen TGG1 und AtNSP3 im Extrakt nachweisen lässt. Jedoch wurde nach Mischung der Extrakte mit TGG1-SCYCE und AtNSP3-VYNE kein Maximum bei 515 nm detektiert (Abb. 21). Als Negativkontrolle wurden Extrakte mit TGG1-SCYCE und CLuc-VYNE verwendet. Die parallel aufgearbeitete Negativkontrolle zeigte ebenfalls kein Maximum bei 515 nm (Abb. A4).

Um auszuschließen, dass die fehlende Fluoreszenzkomplementierung auf eine unzureichende Produktion der Proteine in der Pflanze zurückzuführen ist, wurde stets auch eine Expressionskontrolle aus pExp\_scyce-cnx7 und pExp\_cnx6-vyne mittels *R. radiobacter* in *N. benthamiana* infiltriert. Es wurden Blattscheiben ausgestanzt und unter dem cLSM analysiert. Nur bei ausreichend intensiver Fluoreszenz im Cytosol der Epidermiszellen, die auf die Interaktion zwischen Cnx6 und Cnx7 zurückzuführen war und auf ein ausreichend gutes Expressionsniveau der Konstrukte schließen ließ, wurden die Blätter der zu untersuchenden Proteine geerntet und aufgearbeitet.

Um auszuschließen, dass die fehlende Fluoreszenzkomplementierung auf eine nicht-funktionelle Produktion der Proteine zurückzuführen ist, wurden transient transformierte Blätter von *N. benthamiana* extrahiert und im Enzymassay auf Myrosinase- und NSP-

Aktivität untersucht. Zum Nachweis der Myrosinase-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Nach Produktion von TGG1-SCYCE in Blättern von *N. benthamiana* wurde im Enzymassay das Isothiocyanat des Benzylglucosinolats detektiert (Abb. A7). Damit wurde gezeigt, dass das Fusionsprotein in Bezug auf die Myrosinase-Aktivität funktionell produziert wurde.



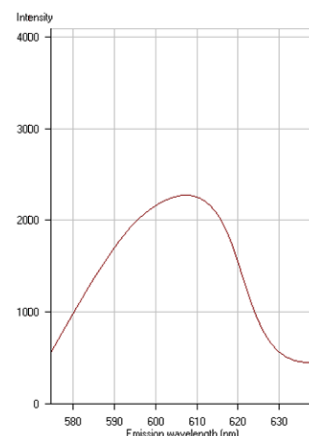
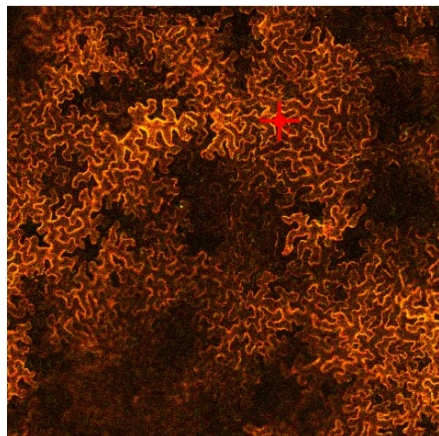
**Abbildung 21: BiFC nach getrennter Produktion von TGG1-SCYCE und AtNSP3-VYNE in *N. benthamiana* und nachfolgender Extraktion.** Vier Tage nach der Infiltration wurden die Extrakte von TGG1-SCYCE und AtNSP3-VYNE getrennt aufgearbeitet. Das vereinigte Extrakt wurde über Nacht bei 4°C gelagert und mit dem cLSM-510META ausgewertet.

Zum Nachweis der NSP-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial von TGG1-SCYCE und AtNSP3-VYNE mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat in Gegenwart von 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Das Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurde detektiert (Abb. A7). Das detektierte korrespondierende Nitril machte rund 14 % der Gesamtmenge der Abbauprodukte des Benzylglucosinolats aus (Abb. A7). Da eine Kontrolle aus TGG1-SCYCE mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  nicht mitgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung des Nitrils des Benzylglucosinolats in geringen Mengen auf die Anwesenheit von zweiwertigem Eisen im Assay zurückzuführen ist. Ob AtNSP3 in *N. benthamiana* funktionell produziert wurde, wurde abschließend nicht geklärt. Ein zu geringes Expressionsniveau eines Interaktionspartners könnte eine mögliche Ursache für das Scheitern der Interaktionsstudien im Blattextrakt sein.

Da einige Probleme der BiFC-Messung in Extrakten durch die Hintergrundfluoreszenz im Bereich des Maximums des BiFC-Komplexes bedingt waren, wurde untersucht, ob die Verwendung anderer Fluoreszenzproteine Vorteile gegenüber VYNE und SCYCE bringt. MCherry ist eine Variante des rot-fluoreszierenden Proteins aus *Dicosoma* sp. [Kodama und Hu, 2012]. Seine Extinktion liegt bei 587 nm, seine Emission bei 610 nm [Kodama und Hu, 2012]. Für die Versuche wurde mCherry in ein N- und ein C-terminales Fragment geteilt [Fan et al., 2007]. Das N-terminale Fragment von mCherry (Aminosäure 1-159) wurde in dieser Arbeit als mCYN bezeichnet, das C-terminale Fragment (Aminosäure 160-236) als mCYC. Vorversuche zeigten, dass der Hintergrund im Bereich von 555 bis 630 nm schwächer ist als im Bereich zwischen 500 bis 575 nm (Abb. A5). Entsprechende BiFC-Konstrukte wurden zunächst für die Modellproteine Cnx6 und Cnx7 hergestellt. Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit den Expressionskonstrukten mittels *R. radiobacter*-Infiltration transformiert. Vier Tage nach der Infiltration wurden die Blattscheiben unter dem cLSM



ausgewertet. Für mCYC-Cnx7 + Cnx6-mCYN wurde eine rot-orange Fluoreszenz im Cytosol detektiert (Abb. 22). Das Fluoreszenzmaximum bei 610 nm des BiFC-Komplexes entsprach dem Maximum von mCherry (Abb. 22). Somit wurde eine erfolgreiche Rekonstitution der mCherry-Fragmente infolge der Interaktion zwischen Cnx6 und Cnx7 gezeigt. Im nächsten Schritt wurde die Extrakterstellung nach Produktion der Modellproteine Cnx6 und Cnx7 etabliert. Nach getrennter Produktion von mCYC-Cnx7 und Cnx6-mCYN in *N. benthamiana* wurden die Extrakte beider Proteine getrennt voneinander aufgearbeitet. Die Extrakte wurden über die Ultrafiltrationseinheit Vivaspin® mit einer Porengröße von 10 kDa filtriert und die Überstände anschließend vereinigt. Die vereinigten Proben wurden anderthalb Stunden bei RT und in Dunkelheit gelagert. In den vereinigten Proben von mCYC-Cnx7 und Cnx6-mCYN wurde kein Maximum bei 610 nm detektiert (Abb. 23). Als Negativkontrolle wurde ein Extrakt mit TGG1-mCYC und Cnx6-mCYN verwendet. Die parallel aufgearbeitete Negativkontrolle zeigte ein vergleichbares Ergebnis wie das Extrakt der Modellproteine: Auch hier wurde kein Fluoreszenzmaximum bei 610 nm detektiert (Abb. 24). Somit führte die Extraktaufbereitung zu keinem befriedigenden Ergebnis. Nach Lagerung der Proben über Nacht wurden sie erneut analysiert. Weder im Extrakt der Modellproteine noch in der Negativkontrolle wurden Veränderungen im Maximum festgestellt (Daten nicht gezeigt). Auch der Einsatz verschiedener Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten sowie der Einsatz des Proteaseinhibitors PMSF führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Trotz der unbefriedigenden Ergebnisse wurde parallel zum Extrakt der Modellproteine ein Extrakt mit TGG1-mCYC und AtNSP3-mCYN aufgearbeitet. Jedoch wurde auch hier kein Maximum bei 610 nm detektiert (Abb. A6).

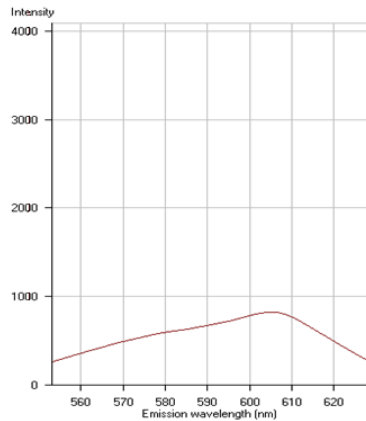


**Abbildung 22:** Interaktionsstudien zwischen mCYC-Cnx7 und Cnx6-mCYN nach Produktion in *N. benthamiana*. Vier Tage nach der Co-Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus mit einem Helium-Neon-Laser aufgenommen. Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse.

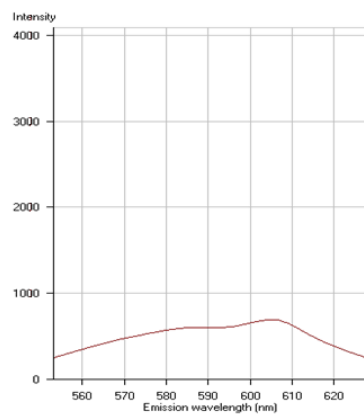
Um auszuschließen, dass die fehlende Fluoreszenzkomplementierung auf eine unzureichende Produktion der Proteine in der Pflanze zurückzuführen ist, wurde stets auch eine Expressionskontrolle aus pExp\_mcy-cnx7 und pExp\_cnx6-mcyn mittels *R. radiobacter* in *N. benthamiana* infiltriert. Es wurden Blattscheiben ausgestanzt und unter dem cLSM analysiert. Nur bei ausreichend intensiver Fluoreszenz im Cytosol der Epidermiszellen, die auf die Interaktion zwischen Cnx6 und Cnx7 zurückzuführen war und auf ein ausreichend gutes Expressionsniveau der Konstrukte schließen ließ, wurden die Blätter der zu untersuchenden Proteine geerntet und aufgearbeitet.

Um auszuschließen, dass die fehlende Fluoreszenzkomplementierung auf eine nicht-funktionelle Produktion der Proteine zurückzuführen ist, wurden transient transformierte Blätter von *N. benthamiana* extrahiert und im Enzymassay auf Myrosinase- und NSP-Aktivität untersucht. Zum Nachweis der Myrosinase-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat inkubiert. Nach Extraktion mit

Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Nach Produktion von TGG1-mCYC in Blättern von *N. benthamiana* wurde im Enzymassay das Isothiocyanat des Benzylglucosinolats detektiert (Abb. A8). Damit wurde gezeigt, dass das Fusionsprotein in Bezug auf die Myrosinase-Aktivität funktionell produziert wurde.



**Abbildung 23: BiFC nach getrennter Produktion von mCYC-Cnx7 und Cnx6-mCYN in *N. benthamiana* und nachfolgender Extraktion.** Vier Tage nach der Infiltration wurden die Extrakte von mCYC-Cnx7 und Cnx6-mCYN getrennt aufgearbeitet. Das vereinigte Extrakt wurde 1,5 h in Dunkelheit gelagert und mit dem cLSM-510META ausgewertet.



**Abbildung 24: BiFC nach getrennter Produktion von TGG1-mCYC und Cnx6-mCYN in *N. benthamiana* und nachfolgender Extraktion.** Vier Tage nach der Infiltration wurden die Extrakte von TGG1-mCYC und Cnx6-mCYN getrennt aufgearbeitet. Das vereinigte Extrakt wurde 1,5 h in Dunkelheit gelagert und mit dem cLSM-510META ausgewertet.

Zum Nachweis der NSP-Aktivität wurde gemörsertes Blattmaterial aus TGG1-mCYC und AtNSP3-mCYN mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat in Gegenwart von 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Das Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurde detektiert (Abb. A8). Das detektierte korrespondierende Nitril machte rund 1 % der Gesamtmenge der Abbauprodukte des Benzylglucosinolats aus (Abb. A8). Da eine Kontrolle aus TGG1-SCYCE mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  nicht mitgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung des Nitrils des Benzylglucosinolats in geringen Mengen auf die Anwesenheit von zweiwertigem Eisen im Assay zurückzuführen ist. Ob AtNSP3 in *N. benthamiana* funktionell produziert wurde, wurde abschließend nicht geklärt. Ein zu geringes Expressionsniveau eines Interaktionspartners könnte eine mögliche Ursache für das Scheitern der Interaktionsstudien im Blattextrakt sein.

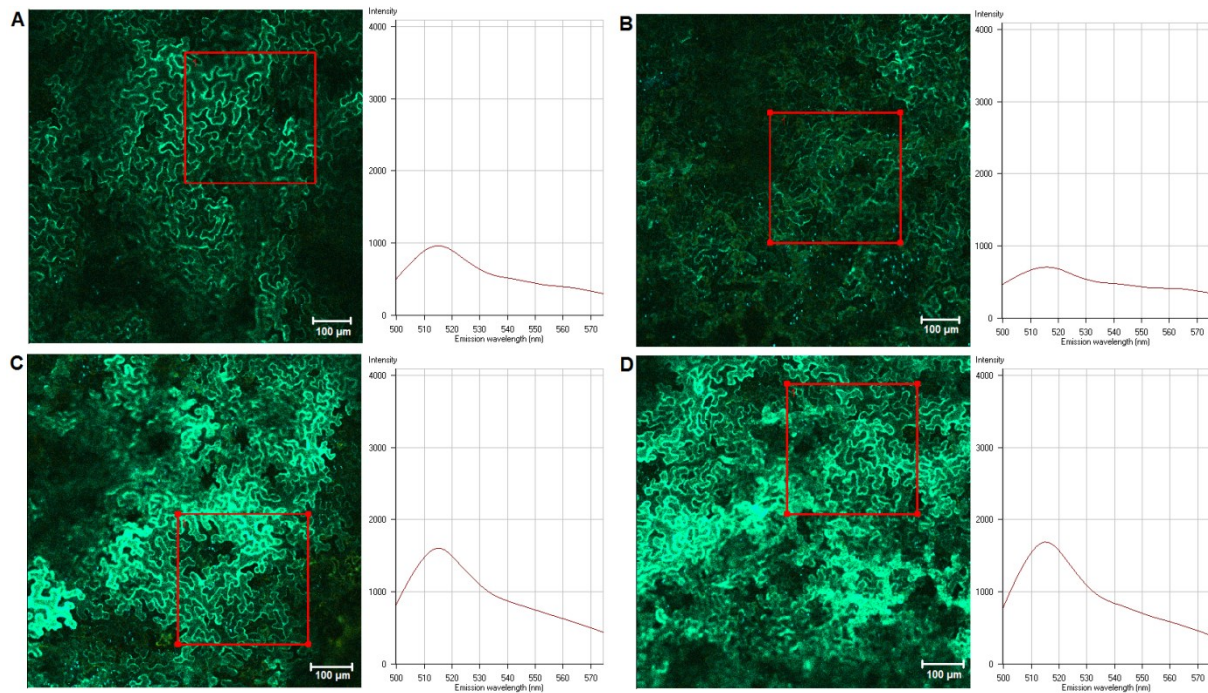
#### 4.3.2.2. TGG1 ohne Signalpeptid und AtNSP3

Die Interaktion zwischen cytosolischer, unglykosylierter TGG1-oSP und AtNSP3 wurde mittels BiFC in intakten Blattscheiben analysiert. Negativkontroll- und Abundanzkontrollprotein wurden so gewählt, dass sie mit TGG1-oSP oder AtNSP3 nicht in Wechselwirkung treten. Als Negativkontrollprotein wurde Cnx1, ein Molybdän-Cofaktor-Biosynthese-Protein, ausgewählt [Kaufholdt et al., 2013], als Abundanzkontrollprotein CLuc, bei dem es sich um den C-Terminus der Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* handelt [Luker et al., 2004; Gehl et al., 2011]. In der Negativkontrolle wurde AtNSP3 durch Cnx1 ersetzt, in den Abundanzkontrollen TGG1-oSP durch CLuc. Mit Hilfe der Abundanzkontrollen wurde die Konzentration von AtNSP3 mit der des Negativkontrollproteins Cnx1 in der Pflanze verglichen. Insgesamt können über Abundanzkontrollen Rückschlüsse auf eine zufällige Interaktion gezogen werden.

Es wurde versucht, eine möglichst gute Vergleichbarkeit herzustellen, indem dem in 3.6.2. dargestellten Infiltrationsschema gefolgt wurde. Um auszuschließen, dass die Reporter-Fragmente VYNE und SCYCE die Interaktionsdomäne von TGG1-oSP oder AtNSP3 maskieren, wurden verschiedene Kombinationen gewählt, bei denen VYNE und SCYCE entweder N- oder C-terminal mit TGG1-oSP und AtNSP3 fusioniert waren.

Der Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE + AtNSP3-VYNE zeigte eine mittelschwache und relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. 25A). Die Negativkontrolle fluoreszierte etwas schwächer als der Interaktionsansatz (Abb. 25B). Die beiden Abundanzkontrollen fluoreszierten etwa gleich intensiv (Abb. 25C, D), sodass auf eine etwa gleich hohe Konzentration an AtNSP3 und Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Interaktionsansatz intensiver fluoreszierte als die Negativkontrolle, sprach das Ergebnis für eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP3-VYNE. Zwei weitere unabhängige Experimente bestätigten dieses Ergebnis. In einem vierten unabhängigen Experiment fluoreszierte der Interaktionsansatz etwas schwächer als die Negativkontrolle, während die beiden Abundanzkontrollen etwa gleich intensiv fluoreszierten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis sprach somit gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP3-VYNE.

In drei unabhängigen Experimenten wurde bei der Untersuchung von TGG1-oSP-SCYCE + VYNE-AtNSP3 ein vergleichbares Ergebnis wie bei der Untersuchung von TGG1-oSP-SCYCE + AtNSP3-VYNE erhalten (Abb. A12), was für eine spezifische Interaktion sprach. Zwei weitere unabhängige Experimente zeigten ein anderes Ergebnis: Der Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE + VYNE-AtNSP3 zeigte eine schwache und relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. 26A). Die Negativkontrolle fluoreszierte im Vergleich zum Interaktionsansatz etwas intensiver (Abb. 26B). Die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + VYNE-AtNSP3 zeigte eine intensivere Fluoreszenz als die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + Cnx1-VYNE (Abb. 26C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von AtNSP3 im Vergleich zu Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Interaktionsansatz schwächer fluoreszierte als die Negativkontrolle, obwohl weniger Cnx1 als AtNSP3 vorhanden war, sprach das Ergebnis gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP3. Insgesamt waren die Ergebnisse für den Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE + VYNE-AtNSP3 uneinheitlich und nicht gut reproduzierbar.



**Abbildung 25: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP3-VYNE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP3-VYNE; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-SCYCE und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und AtNSP3-VYNE; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

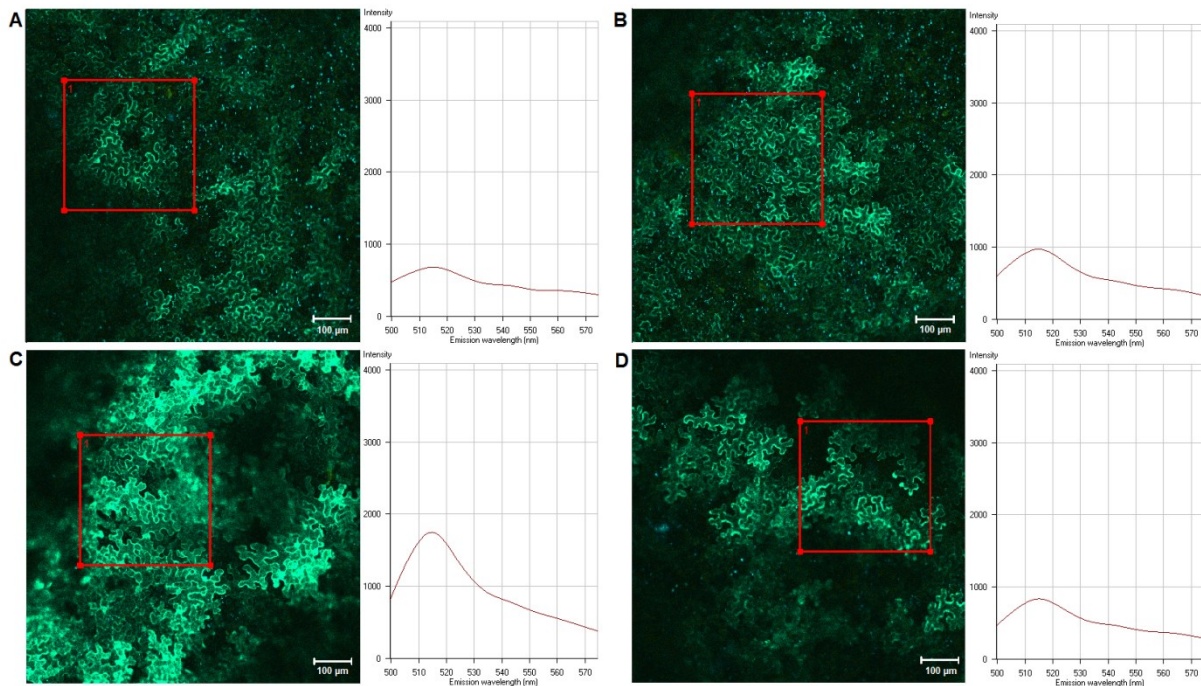
Die Untersuchungen zeigten, dass es eine Rolle spielte, ob das Reporter-Fragment VYNE mit dem N- oder C-Terminus von AtNSP3 fusioniert war. Befand sich VYNE am C-Terminus von AtNSP3 zeigten die Untersuchungen mehrheitlich eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP3-VYNE an. War VYNE N-terminal an AtNSP3 fusioniert, war das Ergebnis nicht eindeutig.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich eine Interaktion auch bei einer Fusion von VYNE mit TGG1-oSP und SCYCE mit AtNSP3 nachweisen lässt. Das Reporter-Fragment VYNE ist rund doppelt so groß wie das Reporter-Fragment SCYCE.

Der Interaktionsansatz TGG1-oSP-VYNE + AtNSP3-SCYCE fluoreszierte mittelschwach und relativ gleichmäßig im Cytosol (Abb. 27A). Die Fluoreszenz der Negativkontrolle war vergleichbar intensiv und regelmäßig wie die des Interaktionsansatzes (Abb. 27B). Die beiden Abundanzkontrollen fluoreszierten etwa gleich intensiv (Abb. 27C, D), sodass auf eine etwa gleich hohe Konzentration von AtNSP3 und Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da die Fluoreszenz des Interaktionsansatzes und die der Negativkontrolle vergleichbar intensiv war, sprach das Ergebnis gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE. Ein zweites unabhängiges Experiment bestätigte dieses Ergebnis. Ein weiteres unabhängiges Experiment zeigte für den Interaktionsansatz TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE eine schwache unregelmäßige Fluoreszenz (Abb. A13A). In der Negativkontrolle leuchteten nur einzelne Zellen schwach (Abb. A13B) und damit fluoreszierte der Interaktionsansatz insgesamt etwas intensiver als die Negativkontrolle. Die Abundanzkontrolle CLuc-VYNE + AtNSP3-SCYCE fluoreszierte etwas schwächer als die Abundanzkontrolle CLuc-VYNE + Cnx1-SCYCE (Abb. A13C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von Cnx1 im Vergleich zu AtNSP3 in der Pflanze geschlossen



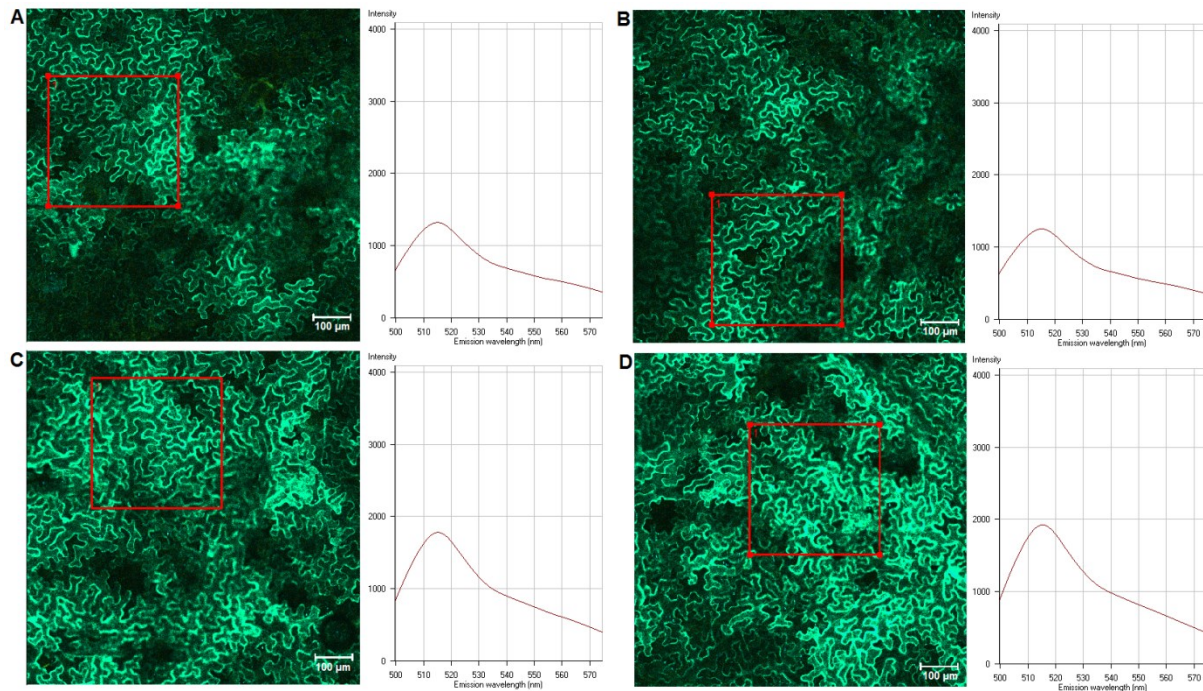
wurde. Da der Interaktionsansatz intensiver fluoreszierte als die Negativkontrolle, sprach dieses Ergebnis für eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE. Insgesamt waren die Ergebnisse für den Interaktionsansatz TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE uneinheitlich und nicht gut reproduzierbar.



**Abbildung 26: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP3 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP3; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-SCYCE und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und VYNE-AtNSP3; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

Der Interaktionsansatz TGG1-oSP-VYNE + SCYCE-AtNSP3 zeigte eine mittelschwache relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. 28A). Die Fluoreszenz der Negativkontrolle war ungleichmäßiger und etwas schwächer im Vergleich zum Interaktionsansatz (Abb. 28B). Die Abundanzkontrolle CLuc-VYNE + SCYCE-AtNSP3 fluoreszierte intensiver und gleichmäßiger als die Abundanzkontrolle CLuc-VYNE + Cnx1-SCYCE (Abb. 28C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von AtNSP3 im Vergleich zu Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen Interaktionsansatz und Negativkontrolle kleiner war als der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen den beiden Abundanzkontrollen, sprach das Ergebnis gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-VYNE und SCYCE-AtNSP3. Zwei weitere unabhängige Experimente bestätigten dieses Ergebnis.

Die Untersuchungen zeigten, dass es keine Rolle spielte, ob das Reporter-Fragment SCYCE mit dem N- oder C-Terminus von AtNSP3 fusioniert war. Die Ergebnisse sprachen mehrheitlich gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP und AtNSP3. Um auszuschließen, dass die C-terminale Fusion von VYNE an TGG1-oSP die Interaktionsdomäne maskiert, wurden auch Kombinationen mit VYNE-TGG1-oSP analysiert.



**Abbildung 27: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-VYNE und Cnx1-SCYCE; C: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und AtNSP3-SCYCE; D: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und Cnx1-SCYCE.

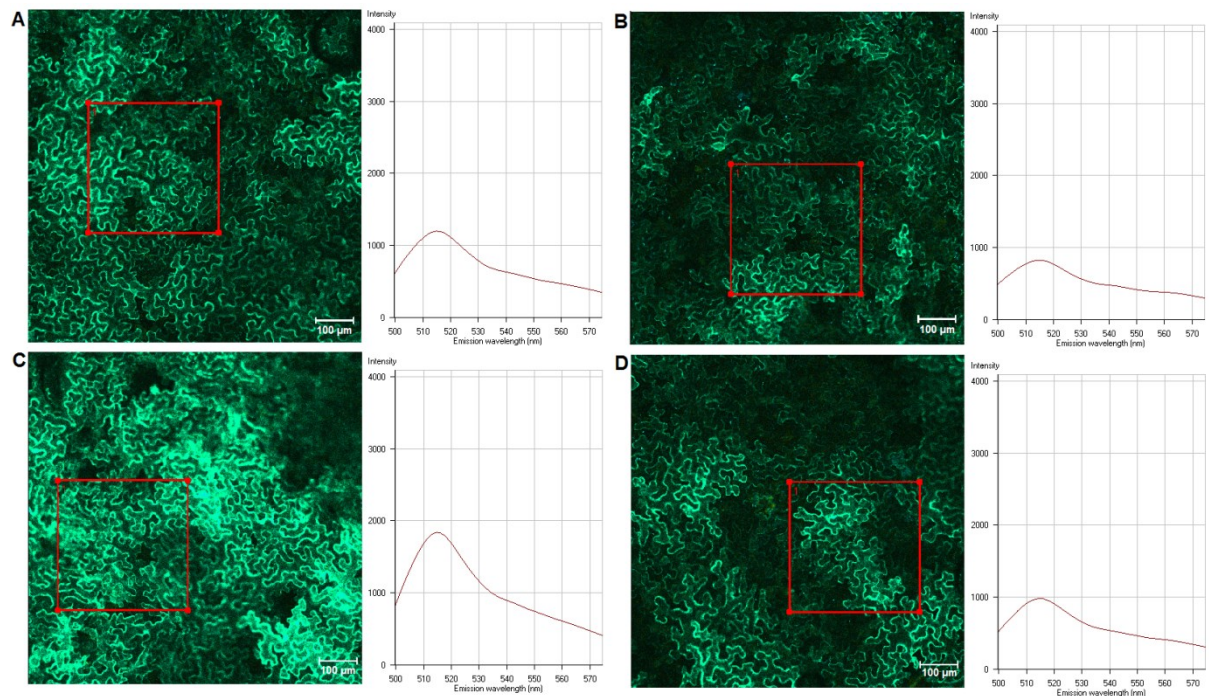
Der Interaktionsansatz VYNE-TGG1-oSP + AtNSP3-SCYCE zeigte eine mittelstarke relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. A14A). Die Negativkontrolle fluoreszierte etwas intensiver als der Interaktionsansatz (Abb. A14B). Die beiden Abundanzkontrollen fluoreszierten etwa gleich intensiv (Abb. A14C, D), sodass auf eine etwa gleich hohe Konzentration von AtNSP3 und Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Interaktionsansatz schwächer fluoreszierte als die Negativkontrolle, lag keine spezifische Interaktion zwischen VYNE-TGG1-oSP und AtNSP3-SCYCE vor. Ein weiteres unabhängiges Experiment bestätigte dieses Ergebnis.

Bei der Untersuchung des Interaktionsansatzes VYNE-TGG1-oSP + SCYCE-AtNSP3 wurde in zwei unabhängigen Experimenten ein vergleichbares Ergebnis wie bei der Untersuchung des Interaktionsansatzes TGG1-oSP-VYNE + SCYCE-AtNSP3 gefunden (Abb. A15), somit war keine spezifische Interaktion nachweisbar.

Die Untersuchungen zeigten, dass es keine Rolle spielte, ob das Reporter-Fragment VYNE N- oder C-terminal mit TGG1-oSP fusioniert war. Die Ergebnisse sprachen mehrheitlich gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP und AtNSP3.

Insgesamt wurde also festgestellt, dass die Ergebnisse für eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP3-VYNE sprachen. Für alle anderen untersuchten Kombinationen waren die Ergebnisse wenig reproduzierbar oder zeigten keine Anzeichen für eine spezifische Interaktion.





**Abbildung 28: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-VYNE und SCYCE-AtNSP3 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-VYNE und SCYCE-AtNSP3; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-VYNE und Cnx1-SCYCE; C: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und SCYCE-AtNSP3; D: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und Cnx1-SCYCE.

Um auszuschließen, dass der fehlende Interaktionsnachweis für einige Kombinationen auf Produktion der Proteine in nicht funktioneller Form zurückzuführen ist, wurden transient transformierte Blätter von *N. benthamiana* extrahiert und im Enzymassay auf Myrosinase- und NSP-Aktivität untersucht. Zum Nachweis der Myrosinase-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Nach Produktion von TGG1-oSP-SCYCE, SCYCE-TGG1-oSP, TGG1-oSP-VYNE bzw. VYNE-TGG1-oSP in Blättern von *N. benthamiana* wurden im Enzymassay keine Abbauprodukte des Benzylglucosinolats detektiert (Daten nicht gezeigt). Es konnte abschließend nicht geklärt werden, ob das Protein nach Produktion in *N. benthamiana* nicht funktionell war oder ob die gebildeten TGG1-oSP-Mengen für den Enzymassay zu gering waren.

Zum Nachweis der NSP-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial aus TGG1-SCYCE mit AtNSP3-VYNE bzw. VYNE-AtNSP3 und das gemörserte Blattmaterial aus TGG1-VYNE mit AtNSP3-SCYCE bzw. SCYCE-AtNSP3 mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat in Gegenwart von 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Das Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurde detektiert (Abb. A9, A10). Das dazugehörige Nitril wurde nur Extrakt mit TGG1-SCYCE und AtNSP3-VYNE detektiert (Abb. A9). Die Menge an Nitril des Benzylglucosinolats machte rund 14 % der Gesamtmenge der Abbauprodukte des Benzylglucosinolats aus (Abb. A9). Da eine Kontrolle aus TGG1-SCYCE mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  nicht mitgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung des Nitrils des Benzylglucosinolats in geringen

Mengen auf die Anwesenheit von zweiwertigem Eisen im Assay zurückzuführen ist. Ob AtNSP3 in *N. benthamiana* funktionell produziert wurde, wurde abschließend nicht geklärt.

### 4.3.3. TGG1 ohne Signalpeptid und AtNSP5

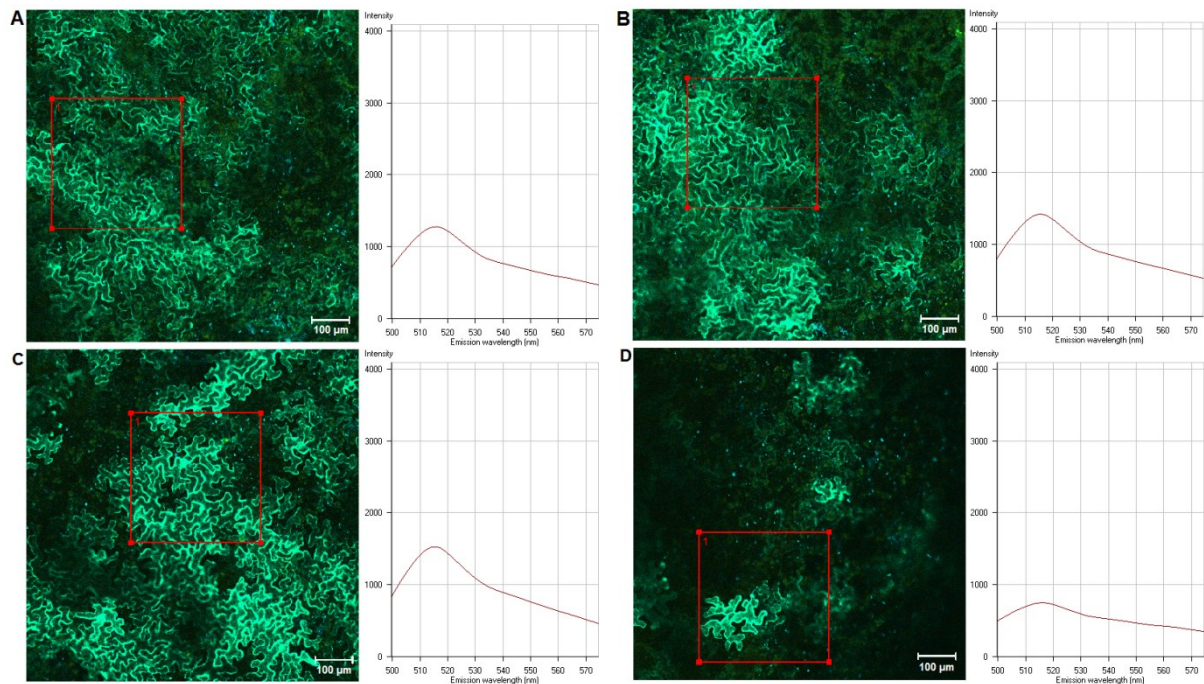
AtNSP5 unterscheidet sich von AtNSP3 durch das Fehlen der N-terminalen Jacalin-ähnlichen Lektindomäne [Burow et al., 2009]. Die Interaktion zwischen cytosolischer, unglykosylierter TGG1-oSP und AtNSP5 wurde mittels BiFC in intakten Blattscheiben analysiert. Negativkontroll- und Abundanzkontrollprotein wurden so gewählt, dass sie mit TGG1-oSP oder AtNSP5 nicht in Wechselwirkung treten. Als Negativkontrollprotein wurde Cnx1, ein Molybdän-Cofaktor-Biosynthese-Protein ausgewählt [Kaufholdt et al., 2013], als Abundanzkontrollprotein CLuc, bei dem es sich um den C-Terminus der Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* handelt [Luker et al., 2004; Gehl et al., 2011]. In der Negativkontrolle wurde AtNSP5 durch Cnx1 ersetzt, in den Abundanzkontrollen TGG1-oSP durch CLuc. Mit Hilfe der Abundanzkontrollen wurde die Konzentration von AtNSP5 mit der des Negativkontrollproteins Cnx1 in der Pflanze verglichen. Insgesamt können über Abundanzkontrollen Rückschlüsse auf eine zufällige Interaktion gezogen werden.

Es wurde versucht, eine möglichst gute Vergleichbarkeit herzustellen, indem dem in 3.6.2. dargestellten Infiltrationsschema gefolgt wurde. Um auszuschließen, dass die Reporter-Fragmente VYNE und SCYCE die Interaktionsdomäne von TGG1-oSP oder AtNSP5 maskieren, wurden verschiedene Kombinationen gewählt, bei denen VYNE und SCYCE entweder N- oder C-terminal mit TGG1-oSP und AtNSP5 fusioniert waren.

Der Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE + AtNSP5-VYNE zeigte eine mittelschwache relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. 29A). Die Negativkontrolle fluoreszierte etwas intensiver als der Interaktionsansatz (Abb. 29B). Die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + AtNSP5-VYNE fluoreszierte wesentlich intensiver und regelmäßiger als die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + Cnx1-VYNE (Abb. 29C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von AtNSP5 im Vergleich zu Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da die Fluoreszenz im Interaktionsansatz schwächer war als in der Negativkontrolle, lag keine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP5-VYNE vor. Zwei weitere unabhängige Experimente bestätigten dieses Ergebnis.

Der Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE + VYNE-AtNSP5 fluoreszierte schwach und unregelmäßig im Cytosol (Abb. 30A). Die Negativkontrolle fluoreszierte deutlich intensiver und regelmäßiger als der Interaktionsansatz (Abb. 30B). Die Abundanzkontrollen fluoreszierten etwa gleich intensiv (Abb. 30C, D), sodass auf eine etwa gleich hohe Konzentration von AtNSP5 und Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Interaktionsansatz deutlich schwächer fluoreszierte als die Negativkontrolle, zeigte die Untersuchung keine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP5 an. Zwei weitere unabhängige Experimente bestätigten dieses Ergebnis.

Die Untersuchungen zeigten, dass es keine Rolle spielte, ob das Reporter-Fragment VYNE N- oder C-terminal mit AtNSP5 fusioniert war. Alle Untersuchungen sprachen gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP und AtNSP5. Um zu überprüfen, ob die C-terminale Fusion von SCYCE mit TGG1-oSP die Interaktionsdomäne maskiert, wurden Kombinationen mit SCYCE-TGG1-oSP getestet.



**Abbildung 29: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP5-VYNE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE und AtNSP5-VYNE; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-SCYCE und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und AtNSP5-VYNE; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

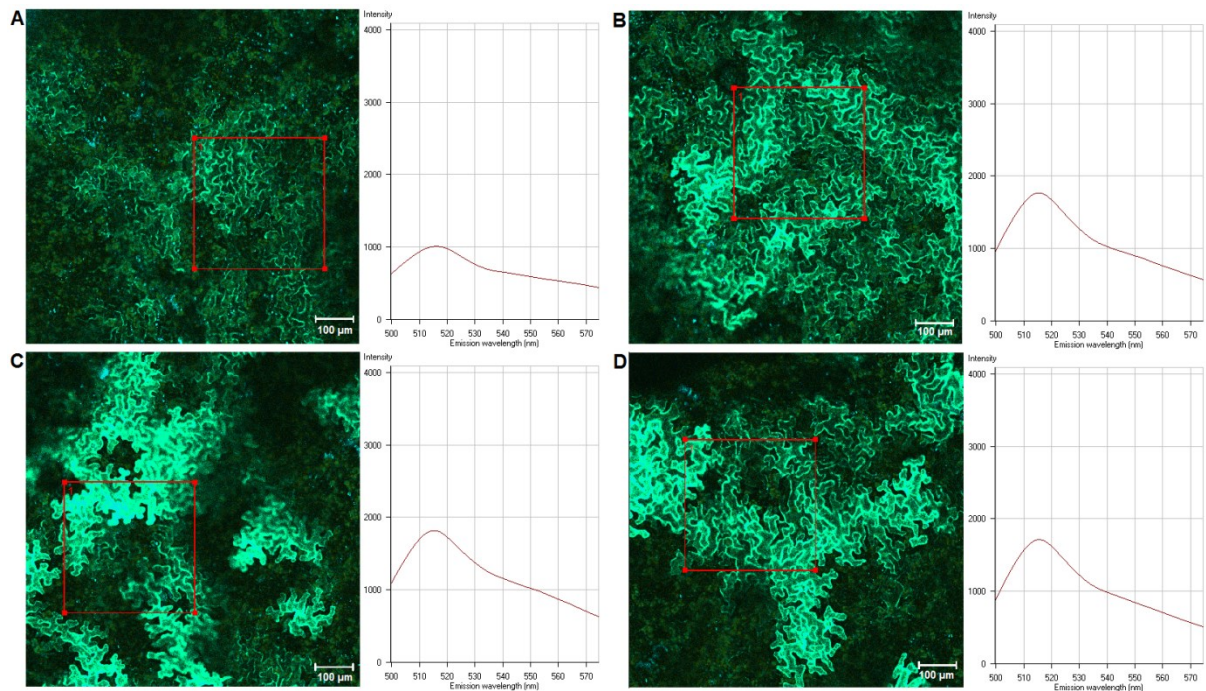
Der Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP + AtNSP5-VYNE fluoreszierte mittelstark und relativ gleichmäßig im Cytosol (Abb. A16A). Die Fluoreszenz der Negativkontrolle war vergleichbar intensiv und regelmäßig wie die des Interaktionsansatzes (Abb. A16B). Die beiden Abundanzkontrollen fluoreszierten etwa gleich intensiv (Abb. A16C, D), sodass auf eine etwa gleich hohe Konzentration von AtNSP5 und Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da die Fluoreszenz des Interaktionsansatzes und die der Negativkontrolle vergleichbar intensiv war, sprach das Ergebnis gegen eine spezifische Interaktion zwischen SCYCE-TGG1-oSP und AtNSP5-VYNE. Ein zweites unabhängiges Experiment bestätigte dieses Ergebnis. Im ersten unabhängigen Experiment konnte insgesamt nur zwei Pflanze ausgewertet werden. Eine Pflanze zeigte das in Abb. A16 dargestellte Ergebnis, die zweite Pflanze zeigte für den Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP + AtNSP5-VYNE ein anderes Ergebnis: Der Interaktionsansatz fluoreszierte sehr schwach und unregelmäßig im Cytosol, jedoch intensiver als die Negativkontrolle (Abb. A17A, B). Die beiden Abundanzkontrollen fluoreszierten etwa gleich intensiv (Abb. A17C, D), sodass auf eine etwa gleich hohe Konzentration von AtNSP5 und Cnx1 geschlossen wurde. Da die Fluoreszenz im Interaktionsansatz etwas intensiver war als in der Negativkontrolle, deutete dies auf eine spezifische Interaktion zwischen SCYCE-TGG1-oSP und AtNSP5-VYNE hin.

Der Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP + VYNE-AtNSP5 zeigte eine mittelschwache relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. A18A). Die Fluoreszenz der Negativkontrolle war ungleichmäßiger und schwächer im Vergleich zum Interaktionsansatz (Abb. A18B). Die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + VYNE-AtNSP5 fluoreszierte wesentlich intensiver und gleichmäßiger als die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + Cnx1-VYNE (Abb. A18C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von AtNSP5 im Vergleich zu Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen Interaktionsansatz und Negativkontrolle kleiner war als der Unterschied der



Fluoreszenzintensitäten zwischen den beiden Abundanzkontrollen, sprach das Ergebnis gegen eine spezifische Interaktion zwischen SCYCE-TGG1-oSP und VYNE-AtNSP5. Ein zweites unabhängiges Experiment bestätigte dieses Ergebnis.

Die Untersuchungen zeigten, dass es keine Rolle spielte, ob das Reporter-Fragment SCYCE N- oder C-terminal mit TGG1-oSP fusioniert war. Die Ergebnisse zeigten überwiegend keine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP und AtNSP5 an.



**Abbildung 30: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP5 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP5; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-SCYCE und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und VYNE-AtNSP5; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

Insgesamt wurde also festgestellt, dass die Ergebnisse aller untersuchten Kombinationen mehrheitlich gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP und AtNSP5 sprachen.

Um auszuschließen, dass der fehlende Interaktionsnachweis für die untersuchten Kombinationen auf Produktion der Proteine in nicht-funktioneller Form zurückzuführen ist, wurden transient transformierte Blätter von *N. benthamiana* extrahiert und im Enzymassay auf Myrosinase- und NSP-Aktivität untersucht. Zum Nachweis der Myrosinase-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Nach Produktion von TGG1-oSP-SCYCE bzw. SCYCE-TGG1-oSP in Blättern von *N. benthamiana* wurden im Enzymassay keine Abbauprodukte des Benzylglucosinolats detektiert (Daten nicht gezeigt). Es kann abschließend nicht geklärt werden, ob das Protein nach Produktion in *N. benthamiana* nicht funktionell war oder ob die gebildeten TGG1-oSP-Mengen für den Enzymassay zu gering waren.

Zum Nachweis der NSP-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial aus TGG1-SCYCE mit AtNSP5-VYNE bzw. VYNE-AtNSP5 mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug

das Volumen der Proben 2000-2500  $\mu$ l. Die Proben wurden mit 1mM Benzylglucosinolat in Gegenwart von 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Das Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurde detektiert (Abb. A11). Das detektierte korrespondierende Nitril machte rund 6-7 % der Gesamtmenge der Abbauprodukte des Benzylglucosinolats aus (Abb. A11). Da eine Kontrolle aus TGG1-SCYCE mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  nicht mitgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung des Nitrils des Benzylglucosinolats in geringen Mengen auf die Anwesenheit von zweiwertigem Eisen im Assay zurückzuführen ist. Ob AtNSP5 in *N. benthamiana* funktionell produziert wurde, wurde abschließend nicht geklärt.

#### 4.3.4. TGG1 ohne Signalpeptid und At3g07720

Die Interaktion zwischen cytosolischer, unglykosylierter TGG1-oSP und At3g07720 wurde mittels BiFC in intakten Blattscheiben analysiert. Negativkontroll- und Abundanzkontrollprotein wurden so gewählt, dass sie mit TGG1-oSP oder At3g07720 nicht in Wechselwirkung treten. Als Negativkontrollprotein wurde Cnx1, ein Molybdän-Cofaktor-Biosynthese-Protein, ausgewählt [Kaufholdt et al., 2013], als Abundanzkontrollprotein CLuc, bei dem es sich um den C-Terminus der Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* handelt [Luker et al., 2004; Gehl et al., 2011]. In der Negativkontrolle wurde At3g07720 durch Cnx1 ersetzt, in den Abundanzkontrollen TGG1-oSP durch CLuc. Mit Hilfe der Abundanzkontrollen wurde die Konzentration von At3g07720 mit der des Negativkontrollproteins Cnx1 in der Pflanze verglichen. Insgesamt können über Abundanzkontrollen Rückschlüsse auf eine zufällige Interaktion gezogen werden.

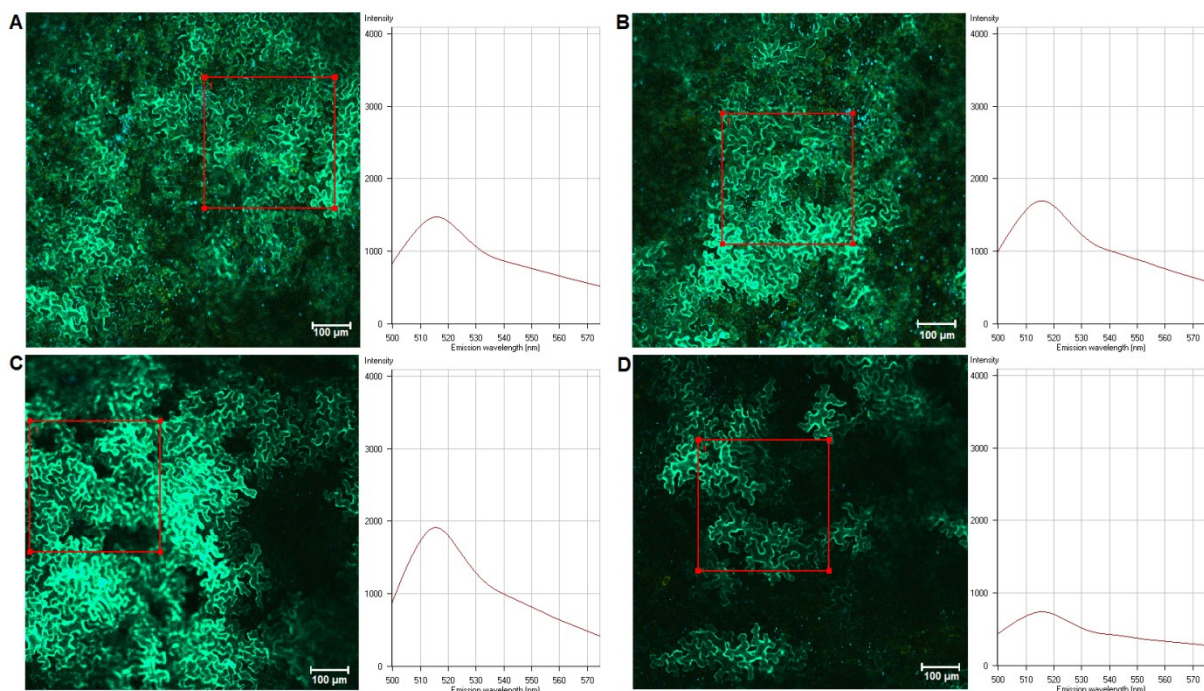
Es wurde versucht, eine möglichst gute Vergleichbarkeit herzustellen, indem dem in 3.6.2. dargestellten Infiltrationsschema gefolgt wurde. Um auszuschließen, dass die Reporter-Fragmente VYNE und SCYCE die Interaktionsdomäne von TGG1-oSP oder At3g07720 maskieren, wurden verschiedene Kombinationen gewählt, bei denen VYNE und SCYCE entweder C- oder N-terminal mit TGG1-oSP und At3g07720 fusioniert waren.

Der Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE + At3g07720-VYNE zeigte eine mittelstarke relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. 31A). Die Negativkontrolle fluoreszierte vergleichbar intensiv und regelmäßig wie der Interaktionsansatz (Abb. 31B). Die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + At3g07720-VYNE fluoreszierte deutlich intensiver und regelmäßiger als die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + Cnx1-VYNE (Abb. 31C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von At3g07720 im Vergleich zu Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Trotz der höheren Konzentration von At3g07720, zeigte der Interaktionsansatz eine vergleichbare Fluoreszenzintensität wie die Negativkontrolle. Damit sprach das Ergebnis gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und At3g07720-VYNE. Ein zweites unabhängiges Experiment bestätigte dieses Ergebnis.

Um zu überprüfen, ob eine C-terminale Fusion von SCYCE mit TGG1-oSP die Interaktionsdomäne maskiert, wurde eine weitere Kombination mit SCYCE-TGG1-oSP getestet.

Der Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP + At3g07720-VYNE zeigte eine mittelschwache relativ gleichmäßige Fluoreszenz im Cytosol (Abb. A19A). Die Fluoreszenz der

Negativkontrolle war ungleichmäßiger und schwächer im Vergleich zum Interaktionsansatz (Abb. A19B). Die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + At3g07720-VYNE fluoreszierte wesentlich intensiver und gleichmäßiger als die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + Cnx1-VYNE (Abb. A19C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von At3g07720 im Vergleich zu Cnx1 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen Interaktionsansatz und Negativkontrolle kleiner war als der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen den beiden Abundanzkontrollen, sprach das Ergebnis gegen eine spezifische Interaktion zwischen SCYCE-TGG1-oSP und At3g07720-VYNE. Im zweiten unabhängigen Experiment wurden insgesamt drei Pflanzen ausgewertet. Eine der drei Pflanzen bestätigte das in Abb. A19 dargestellte Ergebnis. Die beiden anderen Pflanzen zeigten für den Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP + At3g07720-VYNE ein anderes Ergebnis: Der Interaktionsansatz fluoreszierte mittelstark und relativ gleichmäßig im Cytosol (Abb. A20A). Im Vergleich zum Interaktionsansatz fluoreszierte die Negativkontrolle deutlich schwächer und unregelmäßiger (Abb. A20B). Die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + At3g07720-VYNE fluoreszierte schwächer als die Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE + Cnx1-VYNE (Abb. A20C, D), sodass auf eine höhere Konzentration von Cnx1 im Vergleich zu At3g07720 in der Pflanze geschlossen wurde. Da der Interaktionsansatz deutlich intensiver fluoreszierte als die Negativkontrolle, sprach das Ergebnis für eine spezifische Interaktion zwischen SCYCE-TGG1-oSP und At3g07720-VYNE. Insgesamt waren die Ergebnisse für den Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP + At3g07720-VYNE uneinheitlich und nicht gut reproduzierbar.



**Abbildung 31: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-SCYCE und At3g07720-VYNE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE und At3g07720-VYNE; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-SCYCE und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und At3g07720-VYNE; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

Zusammenfassend wurde also festgestellt, dass die Ergebnisse gegen eine spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP-SCYCE und At3g07720-VYNE sprachen. Die Ergebnisse für den Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP und At3g07720-VYNE waren wenig reproduzierbar. Eine Kombination aus TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-At3g07720 wurde von



Hermann Döring im Rahmen einer Bachelorarbeit analysiert. Auch für diese Kombination wurde keine spezifische Interaktion nachgewiesen [Döring, 2016].

Um auszuschließen, dass der fehlende Interaktionsnachweis für die untersuchten Kombinationen auf Produktion der Proteine in nicht-funktioneller Form zurückzuführen ist, wurden transient transformierte Blätter von *N. benthamiana* extrahiert und im Enzymassay auf Myrosinase-Aktivität untersucht. Zum Nachweis der Myrosinase-Aktivität wurde das gemörserte Blattmaterial mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Nach Produktion von TGG1-oSP-SCYCE bzw. SCYCE-TGG1-oSP in Blättern von *N. benthamiana* wurden im Enzymassay keine Abbauprodukte des Benzylglucosinolats detektiert (Daten nicht gezeigt). Es kann abschließend nicht geklärt werden, ob das Protein nach Produktion in *N. benthamiana* nicht funktionell war oder ob die gebildeten TGG1-oSP-Mengen für den Enzymassay zu gering waren.

Da die Funktion von At3g07720 nicht geklärt ist, konnte nicht getestet werden, ob es in *N. benthamiana* funktionell produziert wurde. Frühere Untersuchungen hatten keinen Hinweis auf eine Aktivität als spezifizierendes Protein nach Expression in *E. coli* ergeben [Burow et al., 2009]. Nach heterologe Expression von At3g07720 in *N. benthamiana* war dies noch nicht untersucht worden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein NSP-Aktivitätsassay nach heterologer Expression in *N. benthamiana* durchgeführt. Das gemörserte Blattmaterial aus TGG1-SCYCE mit At3g07720-VYNE wurde mit 500 µl Puffer versetzt. Nach Zentrifugation betrug das Volumen der Proben 2000-2500 µl. Die Proben wurden mit 1 mM Benzylglucosinolat in Gegenwart von 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  inkubiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde gaschromatographisch auf das Vorhandensein von Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats analysiert. Das Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurde detektiert (Abb. A11). Das detektierte korrespondierende Nitril machte rund 14 % der Gesamtmenge der Abbauprodukte des Benzylglucosinolats aus (Abb. A11). Da eine Kontrolle aus TGG1-SCYCE mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  nicht mitgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung des Nitrils des Benzylglucosinolats in geringen Mengen auf die Anwesenheit von zweiwertigem Eisen im Assay zurückzuführen ist.

## 5. Diskussion

### 5.1. Nitrile sind Hauptabbauprodukte der Glucosinolate in wässrigen Homogenaten der Samen und Keimlinge von *A. thaliana* Col-0

Pflanzen der Brassicales nutzen das Glucosinolat-Myrosinase-System als Abwehrsystem gegenüber Fraßfeinden und Pathogenen. Bei Gewebeverletzung wird das Abwehrsystem aktiviert und giftige Isothiocyanate entstehen [Wittstock und Halkier, 2002]. Viele Studien beschäftigen sich mit der biologischen Funktion und Wirkung der Isothiocyanate: Isothiocyanate wirken in der Gasphase, nach Kontakt oder nach Resorption im Insektendarm auf Insekten toxisch [Wittstock et al., 2003]. Neben der Abwehr von herbivoren Insekten dienen Isothiocyanate auch als Schutz vor Mikroorganismen [Chew, 1988; Traka und Mithen, 2009]. Isothiocyanate hemmen das Wachstum des Pilzes *Gaeumannomyces graminis* (*G. graminis*) [Angus et al., 1994]. Weitere *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass Isothiocyanate auf verschiedene Pilzpathogene, die die Wurzeln von Getreide befallen können, giftig wirken [Sawar et al., 1998]. Außerdem wurde die Anreicherung von Isothiocyanaten in der Erde nach Anbau oder Behandlung der Erde mit Pflanzen der Brassicales gezeigt [Gimsing und Kirkegaard, 2009], was die Nutzung von Brassica-Arten zur Biofumigation erklärt [Angus et al., 1994; Sawar et al., 1998; Gimsing und Kirkegaard, 2009].

Untersuchungen in *Arabidopsis* zeigten, dass die Art der beim Glucosinolatabbau gebildeten Produkte natürlichen Variationen unterliegt [Wentzell und Kliebenstein, 2008; Witzel et al., 2015]. Die Profile der Abbauprodukte variieren zwischen den verschiedenen Ökotypen sowie zwischen den verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien einer Pflanze [Lambrix, et al., 2001; Wentzell und Kliebenstein, 2008; Falk et al., 2014; Witzel et al., 2015]. Besonders gut wurde *A. thaliana* Col-0 analysiert [Lambrix, et al., 2001; Wentzell und Kliebenstein, 2008; Falk et al., 2014], da es sich um eine viel genutzte Modellpflanze handelt. Bisher wurden meist nur die Rosettenblätter von Col-0 untersucht: In ihren Homogenaten werden Glucosinolate bei Gewebeverletzung vorherrschend zu Isothiocyanaten abgebaut [Lambrix, et al., 2001; Falk et al., 2014]. Mittlerweile zeigte sich, dass nur in Homogenaten der Blüten, Stängel- und Rosettenblätter von Col-0 überwiegend Isothiocyanate gebildet werden [Lambrix, et al., 2001; Wentzell und Kliebenstein, 2008; Falk et al., 2014]. Hingegen werden Glucosinolate in Homogenaten der Samen, Keimlinge (siehe 4.1.1.; 4.1.4.) und Wurzeln (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung) von Col-0 vorherrschend zu Nitrilen abgebaut. Für die Keimlinge wird das Ergebnis der vorliegenden Arbeit durch eine weitere Studie bestätigt [Wentzell und Kliebenstein, 2008]. Neu dagegen ist der Befund, dass in wässrigen Homogenaten der Samen Glucosinolate überwiegend zu Nitrilen abgebaut werden (siehe 4.1.1.). Der hohe Anteil an Nitril im Großteil der Pflanze könnte eine Erklärung für das Vorkommen von fünf *AtNSP*-Genen sein. Bisher ist jedoch unklar, welchen Nutzen die Pflanze aus der Bildung hoher Mengen Nitril zieht. Bei der Entwicklung von Samen zu Keimlingen nimmt der Glucosinolatgesamtgehalt stark ab [Peterson et al., 2002; Brown et al., 2003]. Als Ursache wird ein interner Glucosinolatabbau ohne Gewebeverletzung diskutiert [Peterson et al., 2002; Brown et al., 2003; Wittstock und Burow, 2010]. Da Isothiocyanate giftig sind [Chew, 1988; Burow und Wittstock, 2009; Wittstock und Burow, 2010], könnte ihre Entstehung beim internen Glucosinolatabbau schädlich für die Pflanze sein. Dies könnte in Samen und Keimlingen ein Grund für den vorherrschenden Abbau der Glucosinolate zu Nitrilen sein. Nitrile können durch Nitrilasen weiter metabolisiert werden [Janowitz et al., 2009]. Insgesamt kommen in *Arabidopsis* vier Nitrilasen (NIT1-NIT4) vor [Bartel und Fink,

1994]. Vermutet wird, dass NIT1-3 in den Glucosinolat-Turnover involviert sind [Vorwerk et al., 2000], während NIT4 für die Cyanid-Entgiftung in der Pflanze verantwortlich ist [Piotrowski et al., 2001]. Bisher fehlen jedoch gesicherte Daten, dass Nitrilasen am Glucosinolat-Turnover beteiligt sind [Wittstock und Burow, 2010]. Warum es in Pflanzen einen Glucosinolat-Turnover gibt und wie dieser in der Pflanze ablaufen könnte, ist unklar. Zukünftig sollte genauer untersucht werden, wie der Glucosinolatgehalt und -abbau sich während der Entwicklung der Samen zu Keimlingen verändert.

Die Analyse der Abbauprodukte in Samen und Keimlingen wurde durch analytische Probleme erschwert (siehe 4.1.1.; 4.1.4.). Momentan sind nur wenige Isothiocyanate kommerziell verfügbar. Es stehen also keine Isothiocyanat-Nitril-Paare mit gleicher Seitenkette zur Verfügung. Somit ist es schwierig zu erfassen, inwieweit die Abbauprodukte wiedergefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch einen Vergleich mit dem Glucosinolatgehalt auf die Wiederfindung der Abbauprodukte geschlossen (siehe 4.1.1.; 4.1.4.). Die Vergleiche zeigten, dass die Wiederfindung der Abbauprodukte, vor allem die der Isothiocyanate, von der Matrix abhängig ist. Insgesamt konnten in die Auswertung der Samen und Keimlinge nur die Abbauprodukte des jeweiligen aliphatischen Hauptglucosinolats einbezogen werden. Daher war es nicht möglich, die eventuelle Substratspezifität der verschiedenen AtNSPs durch Bestimmung der Abbauproduktprofile in Mutanten mit T-DNA-Insertion in *AtNSP*-Genen zu detektieren.

### **5.2. Der Glucosinolatabbau in wässrigen Homogenaten der Samen ist unvollständig**

Im Homogenat der Samen von *A. thaliana* Col-0 wurde nur ein Teil der Glucosinolate infolge der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse abgebaut, d.h. im wässrigen Homogenat waren intakte Glucosinolate nachweisbar (siehe 4.1.1.). Der Glucosinolatabbau im Homogenat der Samen lief also unvollständig ab (siehe 4.1.1.). Längere Inkubationszeiten der Samenhomogenate vor der Extraktion mit Dichlormethan führten nicht zu einer Zunahme im Gehalt der Abbauprodukte (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von früheren Untersuchungen [Dörr, 2014], wurde zunächst vermutet, dass ein unvollständiger Glucosinolatabbau durch mehrmonatige Lagerung der Samen nach der Ernte begünstigt wird. Anders als erwartet, ließ sich aber in der vorliegenden Arbeit kein direkter Zusammenhang zwischen dem Gehalt an intaktem Glucosinolat im wässrigen Homogenat und der Lagerung der Samen erkennen (Abb. 9C, F, I; Tab. A15). Auch wenn Analysen mit Samen eine Woche nach der Ernte durchgeführt wurden, verlief der Abbau unvollständig (Abb. 9C, F, I; Tab. A15). Aus gelagerten Samen wurden zwar tendenziell geringere Mengen an Abbauprodukten gewonnen, der Gehalt an intaktem Glucosinolat im wässrigen Homogenat nahm aber über die Lagerungszeit nicht in gleicher Weise zu (Abb. 9A, C, D, F, G, I; Tab. A14, A15). Eine Erklärung für den unvollständigen Glucosinolatabbau in Homogenaten der Samen könnte sein, dass die Myrosinase-Aktivität möglicherweise in Samen reduziert ist. Eine geringe Aktivität der Myrosinase in Samen von *A. thaliana* Col-0 wurde bereits beschrieben [Petersen et al., 2002]. Untersuchungen zur Expression der Myrosinase, ihrer Aktivität und möglichen Inhibierung in Samen im Vergleich zu anderen Organen sind zukünftig von großem Interesse. Samen von *B. napus* weisen Myrosinase-bindende Proteine (MBPs) auf, die Komplexe mit der Myrosinase bilden [Lenman et al, 1990; Falk et al., 1995]. In Blüten von *A. thaliana* wurden zwei spezifische MBPs identifiziert [Capella et al., 2001]. Bisher wurde

keine hemmende Wirkung der MBPs auf die Aktivität der Myrosinase gezeigt, jedoch könnte ihr Einfluss auf die Myrosinase-Aktivität in Samen von *A. thaliana* zukünftig untersucht werden.

### 5.3. AtNSP2 ist für die Nitrilbildung in Samen verantwortlich

Die Expression von *AtNSP2* ist auf die Samen begrenzt und kein anderes *AtNSP* wird in Samen so stark exprimiert wie *AtNSP2* (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). In Keimlingen (Abb. 11) und den restlichen Pflanzenorganen wird *AtNSP2* nicht exprimiert [Kathrin Meier, persönliche Mitteilung; Kissen und Bones, 2009]. Damit lag es nahe, dass *AtNSP2* in Samen für die Nitrilbildung verantwortlich sein könnte. Mit *nsp2-1* und *nsp2-2* standen zwei T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung, in denen *AtNSP2* nicht exprimiert wurde (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse entsprachen der Erwartung: In Homogenaten der Samen von *nsp2-1* und *nsp2-2* war im Vergleich zum Homogenat des Wildtyps der Gehalt an Nitril des 4MTB-Glucosinolats bis auf Spuren reduziert und der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat signifikant erhöht (Abb. 8B). Die Abnahme an Nitril war stärker als die Zunahme an Isothiocyanat (Abb. 8B). Möglicherweise wurde ein Teil der Isothiocyanate bei der Detektion nicht erfasst. Isothiocyanate sind sehr reaktiv [Wittstock et al, 2003], sodass dies ein Grund für ihre schlechte Wiederfindung sein könnte. Die Ergebnisse zeigten an, dass *AtNSP2* in Samen für die Nitrilbildung verantwortlich ist. Da die Nitrilbildung in *nsp2-1* und *nsp2-2* fast vollständig ausblieb, erschien eine Beteiligung weiterer *AtNSPs* an der Nitrilbildung in Samen unwahrscheinlich. Ob *AtNSP2* die Aglyka von Glucosinolaten mit bestimmter Seitenkette bevorzugt umsetzt, kann im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der schlechten Wiederfindung vieler Abbauprodukte nicht beurteilt werden. Zukünftige Untersuchungen wären hier von großem Interesse. Um dies zu untersuchen, müssten zunächst Standards synthetisiert und analytische Methoden etabliert werden, die eine zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung erlauben.

Es wurden geringe *AtNSP5*-Transkriptlevel in den Samen detektiert (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Die Expression von *AtNSP5* war in *nsp5-1* im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Im Homogenat von *nsp5-1* wurde jedoch keine wesentliche Veränderung im Gehalt der Abbauprodukte des 4MTB-Glucosinolats im Vergleich zum Homogenat des Wildtyps festgestellt (Abb. 8B). Somit leistet *AtNSP5* keinen wesentlichen Beitrag zur Glucosinolat-Hydrolyse in Samen.

Die T-DNA-Insertion in *AtNSP3* (*nsp3-2*) bzw. *AtNSP4* (*nsp4-1*) führte zwar zu einer Abnahme an Nitril des 4MTB-Glucosinolats im Samenhomogenat um rund 40 % im Vergleich zum Homogenat des Wildtyps, ein gleichzeitiger Anstieg an korrespondierendem Isothiocyanat wurde aber nicht verzeichnet (Abb. 8B). Da die Transkripte von *AtNSP3* und *AtNSP4* in Samen des Wildtyps nicht exprimiert werden (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung), ist es eher unwahrscheinlich, dass *AtNSP3* und *AtNSP4* an der Nitrilbildung in Samen beteiligt sind. Der Grund für den erhaltenen Befund einer reduzierten Nitrilbildung in *nsp3-2* und *nsp4-1* ist unklar. Die Samen von *nsp3-2* unterschieden sich im 4MTB-Glucosinolatprofil nicht wesentlich von dem des Wildtyps (Abb. 8A). In Samen von *nsp4-1* war der 4MTB-Glucosinolatgehalt signifikant niedriger als in den Samen des Wildtyps (Abb. 8A). Der niedrige Gehalt an 4MTB-Glucosinolat in Samen von *nsp4-1* könnte somit ein Grund für die niedrige Menge an 4MTB-Glucosinolat-Abbauprodukten im wässrigen

Homogenat sein. Der Gehalt an intaktem 4MTB-Glucosinolat in wässrigen Homogenaten der Samen von *nsp3-2* und *nsp4-1* war gegenüber dem wässrigen Homogenat des Wildtyps nicht wesentlich verändert (Abb. 8C). Insgesamt wäre die Analyse zusätzlicher unabhängiger T-DNA-Insertionslinien notwendig, um das Ergebnis dieser Arbeit abzusichern, bevor die Ursache für die reduzierte Nitrilbildung weiter untersucht wird. Neben der Analyse weiterer unabhängiger Insertionslinien müsste der jeweilige Phänotyp durch Komplementierung, d.h. durch Transformation mit einem Expressionskonstrukt, aufgehoben werden.

### 5.4. AtNSP1 ist in Keimlingen für die Nitrilbildung verantwortlich

In Keimlingen werden alle *AtNSPs* außer *AtNSP2* exprimiert (Abb. 11). Die quantitative Analyse mittels qPCR zeigte, dass *AtNSP1* in Keimlingen im Vergleich zu anderen *AtNSPs* am stärksten exprimiert wird, während *AtNSP3* unter den Bedingungen der qPCR in Keimlingen nicht detektierbar war (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Somit wurde erwartet, dass *AtNSP1* in Keimlingen an der Nitrilbildung beteiligt sein könnte. Die Beteiligung weiterer *AtNSPs* an der Nitrilbildung wäre ebenfalls möglich. Mit *nsp1-1* bzw. *nsp3-2* war jeweils eine T-DNA-Insertionslinie vorhanden, in der *AtNSP1* bzw. *AtNSP3* nicht exprimiert wurde (Abb. 11). Mit *nsp4-1* bzw. *nsp5-1* war ebenfalls nur eine T-DNA-Insertionslinie verfügbar, in der die Expression von *AtNSP4* bzw. *AtNSP5* reduziert war (Abb. 11). Die Ergebnisse entsprachen der Erwartung: Im Homogenat der Keimlinge von *nsp1-1* war der Gehalt an Nitril des 4MTB- bzw. 4MSOB-Glucosinolats signifikant niedriger und der Gehalt an korrespondierendem Isothiocyanat signifikant höher als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 12C, 13C). Auch hier war die Abnahme an Nitril vermutlich aufgrund der schlechten Wiederfindung der Isothiocyanate stärker als die Zunahme an korrespondierendem Isothiocyanat (Abb. 12C, 13C). Die Ergebnisse zeigten, dass *AtNSP1* in Keimlingen für die Nitrilbildung verantwortlich ist und bestätigten damit frühere Untersuchungen [Dörr, 2014]. Da die Wiederfindung vieler Abbauprodukte in Keimlingen schlecht war, ist es schwierig Aussagen über eine bevorzugte Umsetzung der Aglyka von Glucosinolaten mit bestimmter Seitenkette durch *AtNSP1* zu treffen. Um dies zu untersuchen, müssten auch hier zunächst Standards synthetisiert und analytische Methoden etabliert werden.

Da im wässrigen Homogenat der Keimlinge von *nsp1-1* noch Nitrile gefunden wurden (Abb. 12C, 13C), sind vermutlich weitere *AtNSPs* an der Nitrilbildung in Keimlingen beteiligt. Die Untersuchungen der Homogenate von *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* scheinen dies zu bestätigen: Im Homogenat der Keimlinge von *nsp3-2*, *nsp4-1* und *nsp5-1* war der Gehalt an Nitril des 4MTB- bzw. 4MSOB-Glucosinolats deutlich und signifikant niedriger als im Homogenat des Wildtyps (Abb. 12C, 13C). Ein gleichzeitiger Anstieg an korrespondierendem Isothiocyanat war jedoch nicht zu verzeichnen (Abb. 12C, 13C). Der Grund hierfür ist vermutlich wiederum die schlechte Wiederfindung der Isothiocyanate. Der Glucosinolatgehalt in Keimlingen der T-DNA-Mutanten war gegenüber den Keimlingen des Wildtyps unverändert (Abb. 12A, 13A). Wie im Fall der Samen wäre auch für die Keimlinge zu prüfen, ob die Analyse weiterer T-DNA-Insertionslinien vergleichbare Ergebnisse liefert. Auch hier wäre die Komplementierung des Phänotyps notwendig. *AtNSP1*, *AtNSP3* und *AtNSP4* stellen benachbarte Gene dar. Die T-DNA-Insertion in *AtNSP3* (*nsp3-2*) und *AtNSP4* (*nsp4-1*) beeinflusste die Expression von *AtNSP1*: Die Expression von *AtNSP1* war in *nsp3-2* und *nsp4-1* im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Daher

könnte die reduzierte Nitrilbildung in *nsp3-2* und *nsp4-1* auch ein indirekter Effekt sein, der durch verringerte AtNSP1-Aktivität bedingt ist. Auch die T-DNA-Insertion in *AtNSP5* (*nsp5-1*) wirkte sich negativ auf die Expression von *AtNSP1* aus (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Die Ursache ist hier jedoch unklar.

Für zukünftige Untersuchungen könnte es interessant sein, die Expression der *AtNSPs* von der Blüte über Schoten und Samen bis hin zum Keimling zu verfolgen und dabei zu untersuchen, ob TGGs oder NITs coreguliert werden. Bisher ist bekannt, dass *AtNSP1* in Rosettenblättern für die Nitrilbildung verantwortlich ist [Burow et al., 2009], in Wurzeln übernehmen *AtNSP1* und *AtNSP3* diese Aufgabe (Kathrin Meier, persönliche Mitteilung). Verschiedene Myrosinase-Isoformen werden organspezifisch exprimiert (siehe 1.2.), zukünftig wären außerdem Untersuchungen zur Coregulation von *AtNSPs* und Myrosinase von Interesse.

### 5.5. Spezifizierende Proteine sind im Cytosol lokalisiert

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von *AtNSP1*, *AtNSP2*, *AtNSP4*, *AtNSP5*, *At3g07720* und *TaTFP* nach Produktion in *N. benthamiana* bestimmt. Da *AtESP* und *AtNSP3* im Cytosol lokalisiert sind [Burow et al., 2007; Miao und Zentgraf, 2007; Gumz und Wittstock, unveröffentlichte Ergebnisse], wurde erwartet, dass die untersuchten Proteine ebenfalls in diesem Kompartiment der Pflanzenzelle vorkommen. Die Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten Proteine cytosolisch sind (Abb. 14-19). Für eine Lokalisation im Cytosol sprachen die zahlreichen Cytoplasmastränge, die die Epidermiszellen durchzogen und reproduzierbar nachgewiesen wurden (Abb. 14-19). Außerdem befand sich die detektierte Fluoreszenz in den äußeren Randbereichen der Zellen, im Bereich des Cytoplasmaschlauchs (Abb. 14-19). In Vakuolen der Epidermiszellen wurde keine Fluoreszenz detektiert (Abb. 14-19). Die Aussparungen der Fluoreszenz in Zellwänden und Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen bestätigten ebenfalls die cytosolische Lokalisation der untersuchten Proteine (Abb. 14-19). In früheren Untersuchungen wurde eine Lokalisation von *AtESP* im Inneren des Zellkerns diskutiert [Miao und Zentgraf, 2007]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls fluoreszierende Zellkerne gefunden (Abb. 14-19). Die Fluoreszenz war in der Kernperipherie intensiver oder vergleichbar intensiv wie im Inneren des Zellkerns (Abb. 14-19), somit sind alle untersuchten Proteine kerngängig. Für eine eindeutige Kernlokalisierung eines Proteins müsste die Fluoreszenz im Inneren des Zellkerns intensiver sein als in der Kernperipherie [Kaufholdt et al., 2013]. Bei Untersuchungen zur *AtESP*-Lokalisation war die Fluoreszenz im Inneren des Zellkerns vergleichbar intensiv wie in der Kernperipherie [Miao und Zentgraf, 2007], sodass auch *AtESP* eher kerngängig als kernlokalisiert ist.

Wie in 5.1. beschrieben, wird in *A. thaliana* ein Glucosinolatabbau in intaktem Gewebe diskutiert. Glucosinolate sind in Vakuolen lokalisiert, die Myrosinase kommt vorwiegend in Myrosinkörnern der Myrosinzellen vor (siehe 1.3.). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *AtNSPs* cytosolisch lokalisiert sind. Aufgrund der unterschiedlichen Kompartimentierung stellt sich die Frage, inwieweit die *AtNSPs* am internen Glucosinolatabbau ohne Gewebeverletzung beteiligt sein könnten.

### 5.6. Interaktionen zwischen TGG1 und spezifizierenden Proteinen sind *in planta* schwer nachzuweisen

Spezifizierende Proteine führen beim Glucosinolatabbau in Anwesenheit der Myrosinase zur Bildung alternativer Produkte, zeigen aber selber keine enzymatische Aktivität gegenüber den Glucosinolaten [Chew, 1988; Wittstock und Burow, 2007]. Vermutet wird, dass spezifizierende Proteine das Aglykon als Substrat nutzen. Für die Bildung alternativer Produkte müssen sich Myrosinase und spezifizierendes Protein in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dies wurde experimentell mit rekombinant aufgereinigtem AtESP und gereinigter Myrosinase aus *S. alba* gezeigt [Burow et al., 2006b]. *In vitro* wurde die Wechselwirkung zwischen Myrosinase und AtNSP3 mittels *label*-Transfer-Experiment nachgewiesen [Gumz, 2015]. *In vivo*-Interaktionsstudien mit Myrosinase und AtNSP3 mittels Split-Luc-Assay waren nicht erfolgreich [Gumz, 2015]. Möglicherweise wurde die Interaktion zwischen Myrosinase und AtNSP3 *in vivo* sterisch durch die Luciferase-Fragmente behindert [Gumz, 2015]. Ein anderer Grund könnte die Reversibilität der Assoziation der Luciferase-Fragmente gewesen sein, die dazu führte, dass der Komplex aus Myrosinase und AtNSP3 nicht lange genug bestehen blieb, um eine spezifische Interaktion zu messen [Gumz, 2015]. Da die Rekonstitution des BiFC-Komplexes irreversibel ist [Bath et al., 2006] und damit auch kurzlebige Interaktionen nachweisbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierendem Protein mittels BiFC analysiert (siehe 4.3.). Myrosinase und spezifizierende Proteine kommen in unterschiedlichen Kompartimenten der Pflanzenzelle vor (siehe 1.3.; 1.4.), sodass ein direkter Nachweis der Interaktion in Blattscheiben nicht möglich ist. Stattdessen wurde die Interaktion zwischen TGG1 und AtNSP3 im Extrakt bestimmt (siehe 4.3.2.1.). Eine Etablierung der Methode mit Hilfe der Modellproteine Cnx6 und Cnx7 war problematisch. Zwar wurde im Extrakt mit Cnx6 und Cnx7 bei einem Einzelversuch ein Maximum bei 515 nm detektiert (Abb. 20), jedoch war die Reproduktion des Ergebnisses nicht möglich. Da die Positivkontrolle kein reproduzierbares Ergebnis lieferte, müsste die experimentelle Herangehensweise weiter optimiert werden, um zu verlässlichen Aussagen zu kommen. Hauptproblem war die starke Hintergrundfluoreszenz, die im Bereich des erwarteten Maximums lag (Abb. A5A). Diese ging vermutlich von Gewebekomponenten aus, die in intaktem Gewebe kompartimentiert vorliegen. Die komplette Abtrennung fluoreszierender Bestandteile aus den Extrakten mit den Ultrafiltrationseinheiten mit einer Porengröße von 100 kDa gelang nicht. Alternativ wäre ein anderer Wellenlängenbereich geeigneter. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung von mCherry getestet. MCherry zeigt ein Fluoreszenzmaximum bei 610 nm [Kodama und Hu, 2012], es besitzt eine der besten Photostabilitäten, eine kurze Faltungszeit und lässt sich durch den pH-Wert weniger stark beeinflussen als andere Fluoreszenzproteine [Shaner et al., 2004; Merzlyak et al., 2007]. MCherry wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Fan et al., 2007 gesplittet und mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert. Die Rekonstitution des gesplitteten mCherry nach transienter Transformation von *N. benthamiana* mit pExp\_mcy\_cnx7 und pExp\_cnx6\_mcy war erfolgreich. Aufgrund der Interaktion zwischen Cnx6 und Cnx7 wurde in Blattscheiben ein Maximum bei 610 nm detektiert (Abb. 22). Im Blattextrakt mit Cnx6 und Cnx7 wurde jedoch kein Maximum nachgewiesen (Abb. 23). Änderungen in der Extrakterstellung führten nicht zur Detektion eines Maximums bei 610 nm (siehe 4.3.2.1.). Verschiedene pH-Werte wurden bei der Etablierung der Extrakterstellung getestet. MCherry soll eine gleichmäßige und gute Fluoreszenzemission im pH-Bereich zwischen 5,5 bis 9 zeigen [Doherty et al., 2010]. TGG1 hat ein breites pH-Optimum von 4,5 bis 11,5 [Andersson et al., 2009], während die Aktivität spezifizierender Proteine bei einem physiologischen pH-Wert im leicht sauren Milieu am

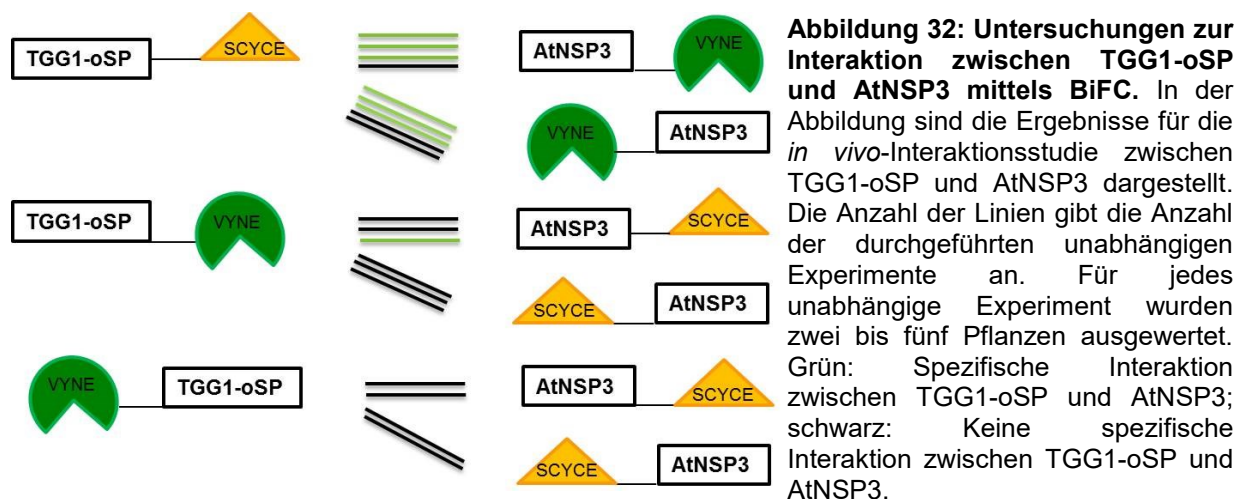
größten ist [Bernadi et al., 2000; Burow et al., 2009]. Der Einsatz von Puffern mit pH-Werten zwischen 6 und 9 führte jedoch nicht zu einer Verbesserung, weder für Cnx6 und Cnx7 noch für TGG1 und AtNSP3 (siehe 4.3.2.1.). Da Salze die Aktivität der Myrosinase reduzieren können [Andersson et al., 2009], wurden neben dem salzreichen Extraktionspuffer weitere salzarme Puffer getestet (siehe 4.3.2.1.). Auch diese Änderung führte zu keiner Verbesserung.

Insgesamt waren die Untersuchungen zur Interaktion zwischen TGG1 und AtNSP3 im Blattextrakt nicht erfolgreich. Möglicherweise führten die langen Zentrifugationszeiten und Filtrationsschritte, die bei der Aufarbeitung der Extrakte notwendig waren, zum Verlust von Proteinen. Eine andere Möglichkeit für das Scheitern der Untersuchungen mit Blattextrakten ist, dass die Fluoreszenz des rekonstituierten Reporterproteins durch Bestandteile anderer Kompartimente gequencht wurde. Dies könnten mögliche Erklärungen dafür sein, dass sich die Interaktion von Cnx6 und Cnx7, die *in vivo* mittels BiFC gut nachweisbar ist [Kaufholdt et al., 2013], im Extrakt nicht reproduzierbar nachweisen ließ. Nach Produktion von TGG1 und AtNSP3 in *N. benthamiana* wurde im Enzymassay Myrosinase-Aktivität gefunden, jedoch keine NSP-Aktivität (Abb. A7, A8). Das Fehlen der NSP-Aktivität kann durch eine nicht-funktionelle Produktion von AtNSP3 in *N. benthamiana* oder durch zu geringe Proteinmengen im Enzymassay verursacht worden sein. Möglicherweise wurden durch die Extraktion der Blätter auch Bestandteile aus anderen Kompartimenten freigesetzt, die die zu untersuchenden Proteine zerstörten, sie am Interagieren hinderten oder die Rekonstitution des Fluoreszenzproteins behinderten bzw. verhinderten. Dies kann trotz Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF nicht ausgeschlossen werden.

Da die Untersuchungen in Blattextrakten erfolglos waren, wurden *in vivo*-Untersuchungen angeschlossen für die TGG1 und AtNSP3 nicht in getrennten Kompartimenten vorlagen, sondern gemeinsam im Cytosol exprimiert wurden. Hierfür wurde TGG1 als Variante ohne Signalpeptid produziert. Dies führte nicht nur zur cytosolischen Lokalisation des Proteins (Abb. A2), sondern verhinderte auch die Glykosylierung. Eine Deglykosylierung der Myrosinase scheint keinen Einfluss auf ihre Aktivität zu haben [Zhou et al., 2012]. Zhou et al., 2012 behandelten glykosylierte und aufgereinigte TGG1 und TGG2 mit PNGase sowie Endo H und stellten durch Verlust der Glykosylierung keine wesentliche Veränderung in der Myrosinase-Aktivität fest. In der vorliegenden Arbeit war aber der Aktivitätsnachweis für TGG1-oSP im Blattextrakt negativ (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise führte die Produktion im Cytosol unter Umgehung des Golgi-Apparats zu einer anderen Proteinfaltung, die wiederum den Aktivitätsverlust verursachte. Möglicherweise ist auch die Stabilität der Myrosinase durch die fehlende Glykosylierung reduziert. Vielleicht war aber auch die eingesetzte Menge an TGG1-oSP im Enzymassay zu gering. Insgesamt war eine Interaktion von TGG1-oSP mit spezifizierendem Protein *in planta* schwer nachweisbar. Für TGG1-oSP und AtNSP3 kann auf Basis der vorliegenden Arbeit eine spezifische Interaktion angenommen werden (siehe 4.3.2.2.; Abb. 32). Gleichzeitig zeigten die Versuche, dass die Reporter-Fragmente die Interaktion zwischen TGG1-oSP und AtNSP3 sterisch behindern können (siehe 4.3.2.2.; Abb. 32). Zwischen TGG1-oSP und AtNSP5 bzw. TaTFP wurde keine spezifische Interaktion nachgewiesen (Abb. 29, 30; Abb. A16, A18) [Döring, 2016]. AtNSP5 und TaTFP unterscheiden sich von AtNSP3 durch das Fehlen der N-terminalen Jacalin-ähnlichen Lektindomäne [Burow et al., 2009; Gumz, 2015]. Aufgrund der Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen mittels *label*-Transfer wird angenommen, dass die Jacalin-ähnliche Lektindomäne für die Interaktion des spezifizierenden Proteins mit der Myrosinase nicht notwendig ist [Gumz, 2015]. Möglicherweise störte die Fusion der Reporter-Fragmente

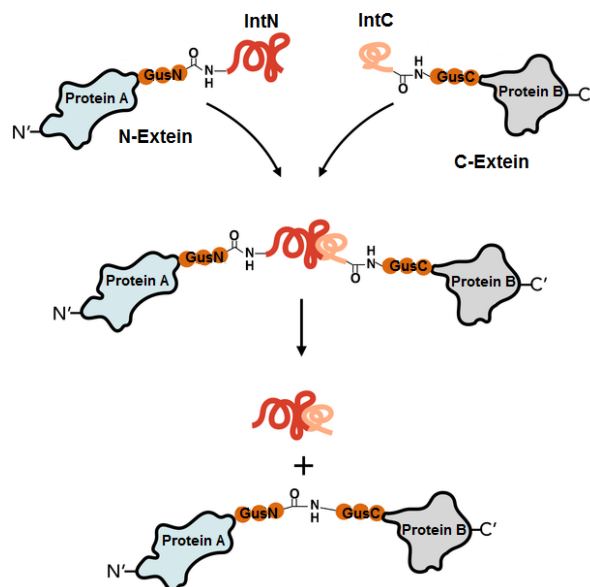


die Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen stärker, wenn die N-terminale Jacalin-ähnliche Lektindomäne fehlte. Die Jacalin-ähnliche Lektindomäne könnte als Abstandhalter zum Reporter-Fragment fungieren und damit die sterische Behinderung der Interaktion durch die Reporter-Fragmente verhindern. Wie für AtNSP3 wurde auch für TaTFP *in vitro* mittels *label*-Transfer-Experiment die Wechselwirkung mit der Myrosinase gezeigt [Gumz, 2015]. TaTFP ist ein Dimer [Gumz et al., 2015], während AtNSP3 ein Monomer ist [Gumz und Wittstock, unveröffentlichte Ergebnisse]. Möglicherweise führte das Vorliegen von TaTFP als Dimer in Kombination mit der Fusion der Reporter-Fragmente zu einer sterischen Behinderung der Interaktion. Für AtNSP3 und AtNSP5 wurde im Enzymassay keine Aktivität nachgewiesen (Abb. A9, A10, A11). Möglicherweise war die eingesetzte Proteinmenge im Enzymassay zu gering oder die Proteine wurden nicht-funktionell in *N. benthamiana* produziert. Jedoch scheint die fehlende Aktivität nicht der Grund für die Schwierigkeiten der *in vivo*-Untersuchungen zu sein, da AtNSP3 mit TGG1-oSP spezifisch interagierte. At3g07720 ist wie die spezifizierenden Proteine ein Kelch-Protein, jedoch wurde für At3g07720 bisher keine Aktivität als spezifizierendes Protein nachgewiesen [Burow et al., 2009]. Da At3g07720 zudem nur eine Übereinstimmung von 44-57 % mit der Aminosäuresequenz der spezifizierenden Proteine zeigt [Kuchernig, 2012], ist eine Interaktion mit der Myrosinase eher unwahrscheinlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit und bei Döring, 2016 wurde zwischen TGG1-oSP und At3g07720 keine spezifische Interaktion nachgewiesen (Abb. 31; Abb. A19) [Döring, 2016]. Wie AtNSP5 und TaTFP weist auch At3g07720 keine Jacalin-ähnliche Lektindomäne auf [Burow et al., 2009].



Für zukünftige Untersuchungen könnte das Split-Intein-System von Interesse sein, bei dem statt eines Fluoreszenzproteins ein Intein in Kombination mit der  $\beta$ -Glucuronidase (Gus) als Reporter zum Einsatz kommt [Wilkens, 2016]. Inteine sind interne Proteinabschnitte, die sich durch Autokatalyse aus dem Vorläuferprotein herausschneiden, wobei die beiden flankierenden Proteinteile, die Exteine, über eine Peptidbindung miteinander verknüpft werden [Perler et al., 1994; Perler, 2005; Mootz, 2009]. Beim Protein-*trans*-Splicing wird das Intein in ein N- und in ein C-terminales Fragment (IntN und IntC) geteilt und jeweils mit einem der Exteine fusioniert [Mootz, 2009]. Wenn sich die Intein-Fragmente wieder zusammensetzen, bildet sich ein aktives Intein [Mootz, 2009], das sich wie oben beschrieben aus der Peptidkette unter Zusammenführen der Exteine herausschneidet. Yang et al., 2003 fusionierten die N- und C-terminalen Fragmente des Reporters Gus (GusN und GusC) als Exteine mit IntN und IntC. Die Untersuchungen zeigten, dass mittels *trans*-Splicing der Reporter Gus wieder vollständig enzymatisch aktiv hergestellt wurde [Yang et al., 2003]. Ein histochemischer Färbeassay zeigte außerdem, dass GusN und GusC selber keine

enzymatische Aktivität besitzen [Yang et al., 2003]. Gus wird häufig für fluorimetrische Untersuchungen eingesetzt, da das Enzym 4-Methylumbelliferylglucuronid zum fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon hydrolysiert [Froebe et al., 1990]. Somit kann im Assay eine Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit gemessen werden. Erste Untersuchungen zur Interaktion zwischen TGG1 und AtNSP3 sowie den Kontrollproteinen Cnx6 und Cnx7 wurden bereits durchgeführt [Wilkens, 2016]. Dazu wurden die Interaktionspartner transient in *N. benthamiana* exprimiert [Wilkens, 2016]. GusN und GusC wurden N- oder C-terminal mit den zu untersuchenden Proteinen (Cnx6, Cnx7, TGG1 oder AtNSP3) fusioniert, am anderen Ende des Gus-Fragments befand sich IntN oder IntC [Wilkens, 2016]. Wenn die zu untersuchenden Proteine interagieren, sollte es zum *trans*-Splicing und zur Bildung eines funktionsfähigen Gus-Reporters kommen (Abb. 33). Ein erster Versuch ergab ein vielversprechendes Ergebnis: Im Extrakt mit TGG1-GusN-IntN und IntC-GusC-AtNSP3 wurde eine hohe Gus-Aktivität gemessen [Wilkens, 2016]. In der Negativkontrolle nahm die Fluoreszenzintensität über die Zeit zwar zu, aber deutlich weniger als im Interaktionsansatz [Wilkens, 2016]. Dieses Ergebnis muss in weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden, bevor auf die Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierendem Protein geschlossen werden kann. Ein Vorteil des Split-Intein-Systems besteht darin, dass es zur kovalenten Verknüpfung der Reporter-Fragmente kommt [Mootz, 2009]. Dadurch kann die Rekonstitution des Reporters z.B. auch nach Gelelektrophorese per Immunoblot mit einem Gus-Antikörper nachgewiesen werden.



**Abbildung 33: Schematische Darstellung des Split-Intein-Systems.**

Das N-Extein besteht aus Protein A und GusN, das C-Extein aus Protein B und GusC [Wilkens, 2016]. Das N-Extein ist mit IntN fusioniert, das C-Extein mit IntC [Wilkens, 2016]. Treten die zu untersuchenden Proteine A und B miteinander in Wechselwirkung, fügen sich die Intein-Fragmente wieder zusammen und das aktive Intein schneidet sich aus dem Vorläuferprotein heraus [Perler et al., 1994; Perler, 2005; Mootz, 2009]. Die interagierenden Proteine sind nun über das rekonstituierte Gus fest miteinander verbunden. Abbildung modifiziert nach <http://2014.igem.org/Team:Heidelberg/Project/Background>.

### 6. Zusammenfassung

Pflanzen der Brassicales nutzen das Glucosinolat-Myrosinase-System zur Verteidigung gegenüber Fraßfeinden und Pathogenen. Bei Gewebeverletzung kommt es zur Hydrolyse der Glucosinolate durch Myrosinasen unter Bildung giftiger Isothiocyanate. In Anwesenheit spezifizierender Proteine entstehen alternative Produkte wie Epithionitrile, Nitrile oder Thiocyanate auf Kosten der Isothiocyanate. Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* besitzt fünf Gene, die für Nitril-spezifisierende Proteine (NSPs) codieren (*AtNSP1-AtNSP5*). Die Anwesenheit von NSPs bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse führt zur Bildung von Nitrilen. Die Funktion der Nitrile und der Mechanismus der alternativen Produktbildung sind bislang noch ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von *AtNSP1-AtNSP5* auf die Bildung der Abbauprodukte in Homogenaten der Samen und Keimlinge von *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) untersucht werden. Um die Funktion spezifizierender Proteine besser zu verstehen, sollte ihre subzelluläre Lokalisation geklärt werden. Außerdem sollte versucht werden, ihre Interaktion mit der Myrosinase TGG1 *in planta* nachzuweisen.

In wässrigen Homogenaten der Samen und Keimlinge von *A. thaliana* Col-0 wurden Glucosinolate vorherrschend zu Nitrilen abgebaut. Der Glucosinolatabbau lief in Samenhomogenaten unvollständig ab. Die Analyse von Mutanten mit T-DNA-Insertion in *AtNSP2* (*nsp2-1* und *nsp2-2*) zeigte, dass *AtNSP2* in Samen für die Nitrilbildung verantwortlich ist. Im Homogenat von Keimlingen der T-DNA-Mutante *nsp1-1* war die Nitrilbildung gegenüber dem Wildtyp stark reduziert. Daher scheint die Nitrilbildung in Keimlingen hauptsächlich von *AtNSP1* abhängig zu sein. Da aber noch Nitrile im Homogenat der Keimlinge von *nsp1-1* detektiert wurden, sind vermutlich weitere *AtNSPs* an der Nitrilbildung beteiligt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *AtNSP3*, *AtNSP4* und *AtNSP5* zur Nitrilbildung in Keimlingen beitragen könnten.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden *AtNSP1*, *AtNSP2*, *AtNSP4*, *AtNSP5*, At3g07720 und das Thiocyanat-formende Protein aus *Thlaspi arvense* in Fusion mit dem Fluoreszenzprotein Venus in *Nicotiana benthamiana* produziert. Alle untersuchten Proteine waren im Cytosol lokalisiert, aber kerngängig.

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen TGG1 und *AtNSP3* mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation *in planta* wurde zunächst versucht, die in verschiedenen Kompartimenten von *N. benthamiana* Zellen in Fusion mit Reporter-Fragmenten produzierten Proteine in einem Blattextrakt zur Interaktion zu bringen. Der Nachweis scheiterte bei Verwendung der Reporter-Fragmente VYNE und SCYCE an einer starken Hintergrundfluoreszenz. Bei Versuchen mit mCherry als Reporter war die Hintergrundfluoreszenz geringer, aber kein Fluoreszenzmaximum im Interaktionsansatz nachweisbar. Daher wurden die Interaktionspartner in weiteren Versuchen im gleichen Kompartiment, im Cytosol, produziert. Damit konnte nur die unglykosylierte Myrosinase (TGG1-oSP) betrachtet werden. Die Versuche zeigten die spezifische Interaktion zwischen TGG1-oSP und *AtNSP3*, wenn TGG1-oSP C-terminal mit SCYCE und *AtNSP3* C-terminal mit VYNE fusioniert war. Unter Verwendung alternativer Fusionsmöglichkeiten war die Interaktion nicht nachweisbar. Wahrscheinlich behinderte die Fusion der Reporter-Fragmente mit den zu untersuchenden Proteinen in diesen Fällen die Interaktion. Entsprechende Untersuchungen mit TGG1-oSP und *AtNSP5* bzw. At3g07720 führten nicht zum Nachweis einer spezifischen Interaktion.

Die Untersuchungen zeigten, dass in *A. thaliana* Col-0 organspezifisch exprimierte NSPs bei Gewebeverletzung für die Entstehung von Nitrilen infolge des Glucosinolatabbaus verantwortlich sind und im Großteil der Pflanze kaum Isothiocyanate gebildet werden. In zukünftigen Studien könnte die Expression der *AtNSPs* über den Entwicklungszyklus der Pflanze analysiert und untersucht werden, welchen Nutzen die Pflanze aus der Nitrilbildung zieht. Dabei sollte auch geklärt werden, ob die NSPs mit Myrosinasen oder Nitrilasen coreguliert werden. Für die Untersuchung der Interaktion zwischen Myrosinase und spezifizierenden Proteinen bietet sich für weitere Studien das Split-Intein-System an.

## 7. Literatur

- Agerbirk, N., Olsen, C.E. and Sørensen, H.**, 1998, Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1563-1571
- Agerbirk, N., de Vos, M., Kim J.H. and Jander, G.**, 2009, Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews* **8**, 101-120
- Andréasson, E., Jørgensen L. B., Höglund A.S., Rask, L. and Meijer, L.**, 2001, Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology* **127**, 1750-1763
- Andréasson, E. and Jørgensen L. B.**, 2003, Chapter four: Localization of plant myrosinase and glucosinolates. *Recent Advances in Phytochemistry* **37** (J. T. Romeo, Ed.). Integrative phytochemistry: From ethnobotany to molecular ecology (pp. 79-99). Amsterdam, Elsevier
- Andersson, D., Chakrabarty, R., Bejai, S., Zhang, J., Rask, L., Meijer, J.**, 2009, Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry* **70**, 1345-1354
- Angus, J.F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A. and Desmarchelier, J.M.**, 1994, Biofumigation: Isothiocyanates released from Brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* **162**, 107-112
- Bernadi, R., Negri, A., Ronchi, S. and Palmieri, S.**, 2000, Isolation of epithiospecifier protein from oil-rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed and its characterization. *Federation of European Biochemical Societies Letter* **467**, 296-298
- Bartel, B. and Fink, G.R.**, 1994, Differential regulation of an auxin-producing nitrilases gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **91**, 6649-6653
- Barth, C. and Jander, G.**, 2006, Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *The Plant Journal* **46**, 549-562
- Bath, R.A., Lahaye T. and Panstruga, R.**, 2006, The visible touch: in planta visualization of protein-protein-interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* **2**, 1-14
- Björkman, R. and Lönnerdal, B.**, 1973, Studies on myrosinase: III. Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds. *Biochimica et Biophysica Acta* **327**, 121-131

- Bones, A.M., Thangstad, O.P., Haugen, O.A. and Espevik, T.**, 1991, Fate of myrosin cell: Characterization of monoclonal antibodies against Myrosinase. *Journal of Experimental Botany* **42**, 1541-1549
- Brown, P.D., Tokuhisha, J.G., Reichelt, M. and Gershenzon, J.**, 2003, Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62**, 471-481
- Buckhout, T.J., Yang, T.J. and Schmidt, W.**, 2009, Early iron-deficiency-induced transcriptional changes in *Arabidopsis* roots as revealed by microarray analyses. *BioMed Central Genomics* **10**, 1-16
- Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S. and Henrissat, B.**, 1997, The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* **5**, 663-675
- Burow, M., Müller, R., Gershenzon, J. and Wittstock, U.**, 2006, Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* **32**, 2333-2349
- Burow, M., Markert, J., Gershenzon, J. and Wittstock, U.**, 2006b, Comparative biochemical characterization of nitrile-forming proteins from plants and insects that alter myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **273**, 2432-2446
- Burow, M., Rice, M., Hause, B., Gershenzon, J. and Wittstock, U.**, 2007, Cell- and tissue-specific localization and regulation of the epithiospecific protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **64**, 173-185
- Burow, M., Bergner, A., Gershenzon, J. and Wittstock, U.**, 2007b, Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum* – identification of the thiocyanate-forming protein. *Plant Molecular Biology* **63**, 49-61
- Burow, M., Losansky, A., Müller, R., Plock, A., Kliebenstein, D.J. and Wittstock, U.**, 2009, The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**, 561–574
- Burow M. and Wittstock U.**, 2009, Regulation and function of specifier proteins in plants. *Phytochemistry Reviews* **8**, 87 – 99

- Capella, A.N., Menossi, M., Arruda, P. and Benedetti, C.E.**, 2001, *COI1* affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. *Planta* **213**, 691-699
- Chen, S., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Schulz, A. and Halkier, B.A.**, 2001, Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 194-201
- Chew, F.S.**, 1988, Chapter 12: Biology effects of glucosinolates. American Chemical Society Symposium Series **380** (H.G. Cutler, Ed.). Biologically active natural products (pp. 155-181). Washington, American Chemical Society
- De Torres Zabala, M., Grant, M., Bones, A.M., Bennett, R., Lim, Y.S., Kissen, R. and Rossiter, J.T.**, 2005, Characterization of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **66**, 859-867
- Döring, H.**, 2016, Untersuchungen zur Lokalisation und Charakterisierung von spezifizierenden Proteinen und ihrem evolutionären Vorläufer At3g07720 (IDI1). Bachelorarbeit TU Braunschweig
- Dörr, F.**, 2014, Untersuchung zur Rolle spezifizierender Proteine in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Doherty, G.P., Bailey, K. and Lewis, P.J.**, 2010, Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation in *Bacillus subtilis*. *BioMed Central Research Notes* **3**, 3-8
- Du, L. and Halkier, B.A.**, 1998, Biosynthesis of glucosinolates in the developing silique walls and seeds of *Sinapis alba*. *Phytochemistry* **48**, 1145-1150
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T. and Talalay, P.**, 2001, The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**, 5-51
- Falk, K.L., Taipalensuu, J., Ek, B., Lenman, M. and Rask, L.**, 1995, Characterization of rapeseed myrosinase-binding protein. *Planta* **195**, 387-395
- Falk, K.L. et al.**, 2014, The role of glucosinolates and the jasmonic acid pathway resistance of *Arabidopsis thaliana* against molluscan herbivores. *Molecular Ecology* **23**, 1188-1203
- Fan, J.-Y., Cui, Z.Q., Wei, H.P., Zhang, Z.P., Zhou, Y.F., Wang, Y.P., Zhang, X.E.**, 2008, Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **367**, 47-53

- Froebe, C., Simone A., Charig, A. and Eigen, E.**, 1990, Axillary malodour production: A new mechanism. *Journal of the Society of Cosmetic Chemist* **41**, 173-185
- Fu, L., Wang, M., Han, B., Tan, D. Sun, X. and Zhang, J.**, 2016, Arabidopsis myrosinase genes *AtTGG4* and *AtTGG5* are root-tip specific and contribute to auxin biosynthesis and root-growth regulation. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1-16
- Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.R. and Hänsch, R.**, 2009, New GATEWAY vectors for high throuput analyses of protein-protein interactions by biomolecular fluorescence complementation. *Molecular Plant* **2**, 1051-1058
- Gehl, C., Kaufholdt, D., Hamisch, D., Bikker, R., Kudla, J., Mende, R.R. and Hänsch, R.**, 2011, Quantitative analysis of dynamic protein-protein interactions *in planta* by floated-leaf luciferase complementation imaging (FLuCI) assay using binary Gateway vectors. *The Plant Journal* **67**, 542-553
- Gil, V. and MacLeod, A.J.**, 1980, The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation. *Phytochemistry* **19**, 2547-2551
- Gimsing, A.L. und Kirkegaard, J.A.**, 2009, Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews* **8**, 299-310
- Guignard, L.**, 1890, Recherches sur la localisation des principes actifs des Crucifères. *Journal de Botanique* **4**, 385-394, 412-430, 435-455
- Gumz, F.**, 2015, Biochemie der Glucosinolathydrolyse: Die Struktur spezifizierender Proteine und ihre Interaktion mit der Myrosinase. Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften
- Gumz, F., Krausze, J., Eisenschmidt, D., Backenköhler, A., Barleben, L., Brandt, W. and Wittstock, U.**, 2015, The crystal structure of the thiocyanate-forming protein from *Thlaspi arvense*, a kelch protein involved in glucosinolate breakdown. *Plant Molecular Biology* **89**, 67-81
- Grob, K. and Matile, P.H.**, 1979, Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Science Letters* **14**, 327-335
- Halkier, B.A. and Du, L.**, 1997, The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Science* **2**, 425-431
- Halkier, B.A. and Gershenzon, J.**, 2006, Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 303-333



- Haughn, G.W., Davin, L., Giblin, M. and Underhill, E.W.**, 1991, Biochemical genetics of plant secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*, the glucosinolates. *Plant Physiology* **97**, 217-226
- Heinricher, E.**, 1884, Über Eiweißstoffe führende Idioblasten bei einigen Crucifere. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **2**, 463-466
- Helmlinger, J., Rausch, T. and Hilgenberg, W.**, 1983, Localization of newly synthesized indole-3-methylglucosinolate (= glucobrassicin) in vacuoles from horseradish (*Armoracia rusticana*), *Physiologia Plantarum* **58**, 302-310
- Höglund, A.-S., Lenman, M., Falk, A. and Rask, L.**, 1991, Distribution of myrosinase in rapeseed tissues. *Plant Physiology* **95**, 213-221
- Höglund, A.-S., Lenman, M. and Rask, L.**, 1992, Myrosinase is localized to the interior of myrosin cells and is not associated to the surrounding tonoplast membrane. *Plant Science* **85**, 165-170
- Hogge, L.R., Reed, D.W. and Underhill, E.W.**, 1988, HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana* and their identification using thermospray liquid chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **26**, 551-556
- Husebye, H., Chadchawan, S., Winge, P., Thanstad, O.P. and Bones, A.M.**, 2002, Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **128**, 1180-1188
- iGEM Team Heidelberg**, 2014, <http://2014.igem.org/Team:Heidelberg/Project/Background>
- Iversen, T.-H., Baggerud, C. and Beiswaag, T.**, 1979, Myrosin cells in Brassicaceae roots, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **94**, 143-154
- Janowitz, T., Trompetter, I. and Piotrowski, M.**, 2009, Evolution of nitrilases in glucosinolate-containing plants. *Phytochemistry* **70**, 1680-1686
- Jørgensen, L.B.**, 1981, Myrosin cells and dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in the order Capparales. *Nordic Journal of Botany* **1**, 433-445
- Kaufholdt, D., Gehl, C., Geisler, M., Jeske, O., Voedisch, S., Ratke, C., Bollhörner, B., Mendel, R.R. and Hänsch, R.**, 2013, Visualization and quantification of protein interactions in the biosynthetic pathway of molybdenum cofactor in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2005-2016

- Kelly, P.J., Bones A. and Rossiter, J.T.**, 1998, Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* **206**, 370-377
- Kissen, R. and Bones, A.M.**, 2009, Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 12057-12070
- Kissen, R., Hyldbaak, E., Wang, C.W., Sørmo, C.G., Rossiter, J.T. and Bones A.M.**, 2012, Ecotype dependent expression and alternative splicing of epithiospecifier protein (ESP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **78**, 361-375
- Kliebenstein, D.J., D'Auria, J.C., Behere, A.S., Kim, J.H., Gunderson, K.L., Breen, J.N., Lee, G., Gershenzon, J., Last, R.L. and Jander, G.**, 2007, Characterization of seed-specific benzoyloxybutylglucosinolate mutations in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **51**, 1062-1076
- Kodama, Y. and Hu., C.-D.**, 2012, Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update und future perspectives. *BioTechniques* **53**, 285-298
- Kong, X.Y., Kissen, R. and Bones, A.M.**, 2012, Characterization of recombinant nitrile-specifier proteins (NSPs) of *Arabidopsis thaliana*: Dependency on Fe(II) ions and the effect of glucosinolate substrate and reaction conditions. *Phytochemistry* **84**, 7-17
- Koncz, C. and Schell, J.**, 1986, The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specifier expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* **204**, 838-396
- Koroleva, O. A., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M.R., Tomos, A.D. and Hedrich, R.**, 2000, Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiology* **124**, 599-608
- Koroleva, O. A., Gibson, T.M., Cramer, R. and Stain, C.**, 2010, Glucosinolate-accumulating S-cells in *Arabidopsis* leaves and flower stalks undergo programmed cell death at early stages of differentiation. *The Plant Journal* **64**, 456-469
- Koroleva, O.A. and Cramer, R.**, 2011, Singel-cell proteomic analysis of glucosinolate-rich S-cells in *A. thaliana*. *Methods* **54**, 413-423
- Kuchernig, J.C., Backenköhler, A., Lübbecke, M., Burow, M. and Wittstock, U.**, 2011, A thiocyanate-forming protein generates multiple products upon allylglucosinolate breakdown in *Thlaspi arvense*. *Phytochemistry* **72**, 1699-1709

**Kuchernig, J.C., Burow, M. and Wittstock, U.**, 2012, Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing plants. *BioMed Central Evolutionary Biology* **12**, 1-14

**Kuchernig, J.C.**, 2012, Evolution spezifizierender Proteine der Ordnung Brassicales. Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften

**Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Ods, T., Kliebenstein, D.J. and Gershenzon, J.**, 2001, The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichopulsia ni* herbivory. *The Plant Cell* **13**, 2793-2807

**Lenman, M., Rodin, J., Josefsson, L.-G. and Rask., L.**, 1990, Immunological characterization of rapeseed Myrosinase. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **194**, 747-753

**Luker, K.E., Smith, M.C.P., Luker, G.D., Gammon, S.T., Piwnica-Worms, H. and Piwnica-Worms, P.**, 2004, Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12288-12293

**Maheshwari, P.N., Stanley, D.W., Beveridge, T.J. and van de Voort, F.R.**, 1980, Localization of myrosinase (thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.3.1) in cotyledon cells of rapeseed. *Journal of Food Biochemistry* **5**, 39-61

**Matile, PH.**, 1980, "Die Senfölbombe": Zur Kompartimentierung des Myrosinasesystems. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **175**, 722-731

**Merzlyak, E.M. et al.**, 2007, Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Method* **4**, 555-557

**Miao, Y. and Zentgraf, U.**, 2007, The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicyl acid equilibrium. *The Plant Cell* **19**, 819-830

**Mootz, H. D.**, 2009, Split inteins as versatile tools for protein semisynthesis. *ChemBioChem - a European journal of chemical biology* **10**, 2579–2589

**Morsy, M., Gouthu, S., Orchard, S., Thorneycroft, D., Harper, J.F., Mittler, R. and Cushman, J.C.**, 2008, Charting plant interactomes: Possibilities and challenges. *Trends in Plant Science* **13**, 183-191

- Nagai, T., Ibata, K., Parl, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A.**, 2002, A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology* **20**, 87-90
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R. and Palmieri, S.**, 1996, *In vitro* cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1014-1021
- Nour-Eldin, H.H., Andersen, T.G., Burow, M., Madsen, R.S., Jørgensen, M.E., Olsen, C.E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D. and Halkier, B.A.**, 2012, NRT/ PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* **488**, 531-534
- Peche, K.**, 1913, Mikrochemischer Nachweis des Myrosins. Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft **31**, 458-462
- Perler, F.B., Davis, E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J. and Belfort, M.**, 1994, Protein splicing elements: inteins and exteins – a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Research* **22**, 1125-1127
- Perler, F.B.**, 2005, Critical Review: Protein Splicing Mechanism and Applications. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **57**, 469-476
- Petersen, B.L., Chen, S., Hansen, C.H., Olsen, C.E. and Halkier, B.A.**, 2002, Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**, 562-571
- Piehl, J.**, 2005, New methodologies for measuring protein interactions *in vivo* and *in vitro*. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, S.4-14
- Piotrowski, M., Schönfelder, S. and Weiler, E.W.**, 2001, The *Arabidopsis thaliana* isogene *NIT4* and its orthologs in tobacco encode  $\beta$ -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 2616-2621
- Raha, S., Merante, F., Proteau, G. and Reed, J.K.**, 1990. Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. *Gene Analysis Techniques* **7**, 173-177
- Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. and Meijer, J.**, 2000, Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* **42**, 93-113

**Reichelt, M., Brown, P.D., Schneider, B., Oldham, N.J., Stauber, E., Tokuhisa, J., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Ods, T. and Gershenzon, J.,** 2002, Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates form *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **59**, 663-671

**Sarsby, J., Towers, M.W., Stain, C., Cramer, R. and Koroleva, O.A.,** 2012, Mass spectrometry imaging of glucosinolates in *Arabidopsis* flowers and siliques. *Phytochemistry* **77**, 110-118

**Sawar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W. and Desmarchelier, J.M.,** 1998, Biofumigation potential of brassicas, III. *In vitro* toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant and Soil* **201**, 103-112

**Scanlon, T. and Willis, D. E.,** 1985, Calculation of flame ionization detector relative response factors using the effective carbon number concept. *Journal of Chromatographic Science* **23**, 333-339

**Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E. and Tsien, R.Y.,** 2004, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**, 1567-1572

**Sofa, A.,** 2015, *Arabidopsis thaliana*: Cultivation, life cycle and functional genomics. *Plant Science Research and Practices*. New York, Nova Science Publishers

**Sønderby, I.E., Geu-Flores, F. and Halkier, B.A.,** 2010, Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends of Plant Science* **15**, 283-290

**Spencer, G. F. and Daxenbichler, M. E.,** 1980, Gas chromatography-mass spectrometry of nitriles, isothiocyanates and oxazolidinethiones derived from cruciferous glucosinolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **31**, 359-367

**Stein, R.J. and Waters, B.M.,** 2012, Use of natural variation reveals core genes in the transcriptome of iron-deficient *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Experimental Botany* **63**, 1039-1055.

**Thangstad, O.P., Iversen, T.H., Slupphaug, G. and Bones A.M.,** 1990, Immunocytochemical localization of myrosinase in *Brassica napus* L. *Planta* **180**, 245-248

**Thangstad, O.P., Evjen, K. and Bones, A.,** 1991, Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae. *Protoplasma* **161**, 85-93

- Thangstad, O.P., Gilde, B., Chadchawan, S., Seem, M., Husebye, H., Bradley, D. and Bones, A.M.**, 2004, Cell specific, cross-species expression of myrosinase in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* **54**, 597-611
- Tookey, H.L.**, 1973, Crambe thioglucoside glucohydrolase (EC 3.2.3.1): Separation of a protein required of epithiobutane formation. *Canadian Journal of Biochemistry* **51**, 1654-1660
- Traka, M. and Mithen, R.**, 2009, Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews* **8**, 269-282
- Uda, Y., Kurata, T. and Arakawa N.**, 1986, Effects of pH and ferrous ion on the degradation of glucosinolates by Myrosinase. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 2735-2740
- Ueda, H., Nishiyama, C., Shimada, T., Koumoto, Y., Hayashi, Y., Kondo, M., Takahashi, T., Ohtomo, I., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.**, 2006, AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells. *Plant Cell Physiology* **47**, 164-175
- Urzica, E.I. et al.**, 2012, Systems and trans-system level analysis identifies conserved iron deficiency responses in the plant lineage. *Plant Cell* **24**, 3921-3948
- Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Müller, A., Weiler, E.W. and Piotrowski, M.**, 2000, Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **212**, 508-516
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R. and Kudla, J.**, 2008, Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes *in planta*. *The Plant Journal* **56**, 505-516
- Wang, M., Xuepiao, S., Deguan, T., Gon, S., Meijer, J. and Zhang, J.**, 2009, The two non-functional myrosinase genes *TGG3* und *TGG6* in *Arabidopsis* are expressed predominantly in pollen. *Plant Science* **177**, 371-375
- Weidmann, J., Schenk, A., Röcker, C., Girod, A., Spindler, K.-D. and Nienhaus, G.U.**, 2002, A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmeae quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11646-11651
- Wentzell, A.M. and Kliebenstein, D.J.**, 2008, Genotype, age, tissue, and environment regulate the structural outcome of Glucosinolate activation. *Plant Physiology* **147**, 415-428

- Wilkens, M.**, 2016, Etablierung des Intein-Systems zur Analyse der *in vivo* und *ex vivo* Interaktion von pflanzlichen Proteinen in *Nicotiana benthamiana*. Bachelorarbeit TU Braunschweig
- Wittstock, U. and Halkier, B.A.**, 2002, Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. Trends in Plant Science **7**, 263-270
- Wittstock, U., Kliebenstein, D.J., Lambrix, V., Reichelt, M. and Gershenzon, J.**, 2003, Chapter five: Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. Recent Advances in Phytochemistry **37** (J. T. Romeo, Ed.). Integrative phytochemistry: From ethnobotany to molecular ecology (pp. 101-125). Amsterdam, Elsevier
- Wittstock, U. and Burow, M.**, 2007, Tipping the scales – specifier proteins in Glucosinolate hydrolysis. International Union of Biochemistry and Molecular Biology *Life* **59**, 744-751
- Wittstock, U. and Burow, M.**, 2010, Glucosinolate breakdown in Arabidopsis: Mechanism, regulation and biological significance. The Arabidopsis Book: e0134. doi: 10.1199/tab.0134 (Torii, K., Chang, C., Comai, L., Jander, G., Kliebenstein, D., Last, R., Lister, R., McClung, R., Millar, H. and Wagner, D., Eds.), American Society of Plant Biologists
- Witzel, K., Hanschen, F.S., Klopsch, R., Ruppel, S., Schreiner, M. and Grosch, R.**, 2015, *Verticillium longisporum* infection induces organ-specific glucosinolate degradation in *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant Science **6**, 1-11
- Yang, J., Fox, G.C. Jr. and Henry-Smith, T.V.**, 2003, Intein-mediated assembly of a functional  $\beta$ -glucuronidase in transgenic plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**, 3513-3518
- Zhang, J., Pontoppidan, B., Xue, J., Rask, L. and Meijer, J.**, 2002, The third myrosinase gene TGG3 in *Arabidopsis thaliana* is a pseudogene specifically expressed in stamen and petal. Physiologia Plantarum **115**, 25-34
- Zhang, W., Wang, W., Liu, Z., Wang, H., Mu, Y., Huang, Y. and Feng, Y.**, 2016, Crystal structure of the epithiospecifier protein, ESP from *Arabidopsis thaliana* provides into its product specificity. Biochemical and Biophysical Research Communications **478**, 746-751
- Zhao, Z., Zhang, W., Stanley, B.A. and Assmann, S.M.**, 2008, Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. The Plant Cell **20**, 3210-3226

**Zhou, C., Tokuhisa, J.G., Bevan, D.R. and Esen, A.**, 2012, Properties of  $\beta$ -thioglucoside hydrolases (TGG1 und TGG2) from leaves of *Arabidopsis thaliana*. Plant Science **191-192**, 82-92

**Zrybko, C.L., Fukuda, E.K., Rosen, R.T.**, 1997, Determination of glucosinolates in domestic and wild mustard by high-performance liquid chromatography with confirmation by electrospray mass spectrometry and photodiode-array detection. Journal of Chromatography A **767**, 43-52



## Anhang

## A.1. Tabellen

Tabelle A1: Oligonukleotide für die semiquantitative RT-PCR.

Gen	Sequenz (5' → 3')	Sequenz (5' → 3')
<i>AtNSP1</i>	<b>NSP1-RT2a.fw:</b> ATGTAGGGCAAGCACAATAC	<b>NSP1-RT2a.rev:</b> ACGATATGACGTCAGAAATGA
<i>AtNSP2</i>	<b>RF2F:</b> CTATATATCATCGCCGGCCACTC	<b>RT2R:</b> CACAAGTGGGTGCAGTGTTTCG
<i>AtNSP3</i>	<b>RT3F:</b> GCCTATCGTTAAAAAACCTGGG G	<b>RT3R:</b> GATAAGTTTGAGGGGACTCCGAGTA G
<i>AtNSP4</i>	<b>RT4F:</b> GATCCGAATACGACGCTGTGAC	<b>NSP4-RT3.rev:</b> GGGAGACATTCCAACCCTCT
<i>AtNSP5</i>	<b>NSP5-RT2.fw:</b> GAGAACAAATGGTTAAAGGTGG G	<b>RT5R:</b> GAGACGTTAGTGTGGGAGAGGATTG
<i>Aktin8</i>	<b>Aktin8fw:</b> AGCTGTTCTATCACTTTACGCCA G	<b>Aktin8rev:</b> GATCCCTGCAGCTTCCATCC

Tabelle A2: Oligonukleotide zur Herstellung der *attB*-PCR-Produkte.

Abkürzung	Sequenz (5' → 3')
<b>P1</b>	<b>Myr_ohneSP_attB1-fow:</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGACGAGTTTG TTTGTGAAGAGAACG
<b>P2</b>	<b>R_C_Myr_L_attB2 (Eurofins MWG Operon):</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCATCTGCAAGACTCT TCCG
<b>P3</b>	<b>Rev Primer R-N_Myr_L-attB2 (Eurofins MWG Operon):</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATGCATCTGCAAGAC TCTTCCG

Tabelle A3: Oligonukleotide zur Herstellung der *attB*-PCR-Produkte. Fortsetzung der Tabelle auf S. XX.

Abkürzung	Sequenz (5' → 3')
<b>P4</b>	<b>NSP1_attB1_fow:</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGCCCAAAGC TAGAAGCAAAGG
<b>P5</b>	<b>Rev_NSP1_attB2:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC GGCAGAGTCAATCCCGTAAAAGAAGAG
<b>P6</b>	<b>Rev_NSP1_attB2_mitStop:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGCAGAGTCAATCC CGTAAAAGAAGAG
<b>P7</b>	<b>NSP2_attB1_fow:</b> GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTTAACCATGGTGCAAAGGTGGAAGCAAGG

<b>P8</b>	<b>Rev_NSP2_attB2:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCGTCTGCAGAGTCAACTCCAT AAAAGAAGAG
<b>P9</b>	<b>Rev_NSP2_attB2_mitStop:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATGCAGAGTCAACTC CATAAAAGAAGAG
<b>P10</b>	<b>NSP4_attB1_fow:</b> GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTTAACCATGGCCCAAAGGTTGAAGCACAAGG
<b>P11</b>	<b>Rev_NSP4_attB2:</b> GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTGCGCAGAGTCAATTCCGTAAAAGAAGAG
<b>P12</b>	<b>Rev_NSP4_attB2_mitStop:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGCAGAGTCAATTC CGTAAAAGAAGAG
<b>P13</b>	<b>NSP5_attB1_fow:</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGTGTCCGGTGG AGAACAAATGG
<b>P14</b>	<b>Rev_NSP5_attB2:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATTGACATTAAGATGAG AGAAACC
<b>P15</b>	<b>Rev_NSP5_attB2_mitStop:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTTTAATTGACATTAAGATG AGAGAAACC
<b>P16</b>	<b>attb1-TaTFP_fow (Eurofins MWG Operon):</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTCGGACTTTGC AAGGCG
<b>P17</b>	<b>R_C-TaTFP_attB2 (Eurofins MWG Operon):</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGTGGAGGAATTGACTG CGAAG
<b>P18</b>	<b>R_N-TaTFP_attB2 (Eurofins MWG Operon):</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACGTGGAGGAATTGA CTGCG

**Tabelle A4: Oligonukleotide zur Herstellung attB-PCR-Produkte.** Fortsetzung der Tabelle auf S. XXI.

<b>Abkürzung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
<b>P19</b>	<b>F_attB1_Myr_Ler (Eurofins MWG Operon):</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAGCTTCTTAT
<b>P20</b>	<b>Fusion_Myr_mCherry-c_rev:</b> CCTCTGCTTGATCTCGCCCTTCAGGGCGCCAGATCCTCCTCCTCCAGA TCCTCCTCCTCCTGCATCTGCAAGACTCTTCCGATCACGG
<b>P21</b>	<b>Fusion_Myr_mCherry-c_fw:</b> CCGTGATCGGAAGAGTCTTGCAGATGCAGGAGGAGGAGGATCTGGAG GAGGAGGATCTGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGG
<b>P22</b>	<b>mCherry-c_attB2_mitStop_rev:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACTTGTACAGCTCGTC CATGCCGCC
<b>P23</b>	<b>For_attB1_NSP3 (Eurofins MWG Operon):</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCCAAAGCT
<b>P24</b>	<b>Fusion_NSP3_mcherry-n_rev:</b> CCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATAGATCCTCCTCCTCCAGA TCCTCCTCCTCCGACAGAGTCAATTCCGTAAAAGAAGAGG

<b>P25</b>	<b>Fusion_NSP3_mcherry-n_fw:</b> CCTCTTCTTTTACGGAATTGACTCTGTCCGAGGAGGAGGATCTGGAGG AGGAGGATCTATGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGG
<b>P26</b>	<b>attB1_mCherry_c_ohneStop_fw:</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGGGCGCCCTGAA GGGCGAGATCAAGC
<b>P27</b>	<b>Fusion_mCherry_c_Cnx7_mStop_rev:</b> CTTTCAATCTTTGTAACCTTCTTTGTCCATAGATCCTCCTCCTCCAGATCC TCCTCCTCCCCTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCGGTGG
<b>P28</b>	<b>Fusion_mCherry_c_Cnx7_mStop_fw:</b> CCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAGGAGGAGGATCTGGA GGAGGAGGATCTATGGACAAAGAAGTTACAAAGATTGAAAG
<b>P29</b>	<b>Cnx7_mitStop_attB2_rev:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGCCGCCGCTTATCGG AGGTATGATGG
<b>P30</b>	<b>attB1_Cnx6_fw:</b> GGGGAC AAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACCATGTCTGCAGAG GAGAAGAAC CTTATAG
<b>P31</b>	<b>Fusion_Cnx6_mCherry-n_rev:</b> CCATGTTAT CCTCCTCGCCCTTGCTCACCATAGATCCTCCTCCTCCAGATCCTCCTCC TCCAGAAGAAGATTTGTTATCTCCTGTAATATC
<b>P32</b>	<b>Fusion_Cnx6_mCherry-n_fw:</b> GATATTACAGGAGATAACAAATCTTCTTCTGGAGGAGGAGGATCTGGAG GAGGAGGATCTATGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGG

Tabelle A5: Oligonukleotide für die Kontroll-PCR.

Expressionsvektor	Sequenz (5'→3')	Sequenz (5'→3')
<b>pExp_tgg1-scyce</b>	<b>XhoI_TGG1_fow:</b> CTTACTCGAGATGAA GCTTCTTATGCTCGC	<b>TGG1_BamH1_rev:</b> GAATGGATCCTCATGCATCTG CAAGACTC
<b>pExp_atnsp3-scyce</b>	<b>EcoRI_NSP3_fow:</b> CGATG AATTCATGGC CCAAAAGCTAGTTGC	<b>NSP3_SalI_rev:</b> GCATGTCGACTCAGACAGAGT CAATTCCG

Tabelle A6: Oligonukleotide zur Sequenzierung der Expressionsvektoren.

Expressionsvektor	Sequenz (5'→3')	Sequenz (5'→3')	Sequenz (5'→3')
<b>pExp_tgg1-scyce</b>	<b>35S.fow:</b> CCCACTATCCTTC GCAAGACCC	<b>TGG1_int_seq_fow</b> (Thermo Scientific): ATTCTCCATTGCGTG GTCAAG	<b>TGG1int2_fow:</b> GTTGGTGATCGGCTT CCAG
<b>pExp_atnsp3-scyce</b>	<b>35S.fow:</b> CCCACTATCCTTC GCAAGACCC	<b>NSP3_SalI.rev:</b> GCATGTCGACTCAGA CAGAGTCAATTCCG	<b>NSP_int_1_3_4.fow:</b> ACCAAATCAGCC CATCG

Tabelle A7: Oligonukleotide zur Sequenzierung hergestellter Entryvektoren.

Primer	Sequenz (5' → 3')
M13 uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC
NSP_int_1_3_4.fow	ACCAAATCA GCCCATCG
TGG1_int_seq_fow	ATTCTCCATTGCGTGGTCAAG
TGG1int2_for	GTTGGTGATCGGCTTCCAG

Tabelle A8: Oligonukleotide zur Sequenzierung der Produkte der Expressionsanalyse.

Primer	Sequenz (5' → 3')
T7 fow	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6 rev	CTATAGTGTCACCTAAAT

Tabelle A9: Verwendete Geräte. Fortsetzung der Tabelle auf S. XXIII.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec VX-120	Systec GmbH, Linden
Brutschrank	Hareaus instruments B6060	Thermo Electron Coporation/ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Elektroporator	Gene Pulser Xcell™/ MicroPulser™	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Flammenionisations- detektor	-	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Ko.KG, Waldbronn
Gaschromatograph	Gaschromatograph 6890 N	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Ko.KG, Waldbronn
Spannungsquelle für die Gelelektrophorese	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Spannungsquelle für die Gelelektrophorese	Consort Microcomputer Electrophoresis Power Supply, Model E425	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Heizblock	Block-Thermostat TH 21	HLC BioTech, Ditabis AG, Pforzheim
HPLC	HP 1200	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Ko.KG, Waldbronn
Imager	Chemidoc™ XRS <sup>+</sup> Molecular Imager®	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Inkubationsschüttler/- schrank	Infors HT	Infors AG Bottmingen, Bottmingen, Schweiz
Inkubationsschüttler	Infors HT Minitron	Infors AG Bottmingen, Bottmingen, Schweiz
Kurztagkammer/ Langtagkammer	CLF PlantClimatics AR-66I	CFL PlantClimatics GmbH, Wertingen
Konfokales Laser- Scanning-Mikroskop	cLSM-510META	Carl Zeiss AG, Oberkochen

<b>Lyophilisator</b>	Gamma 1-20	Martin Christ Gefriertrocknungsanlage, Osterode am Harz
<b>Massenspektrometer</b>	5975B	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co.KG, Waldbronn
<b>Mikrowelle</b>	R3G16/ R941INW	Sharp, Osaka, Japan
<b>Mikrowelle</b>	Solo Mikrowelle NN-E201W	Panasonic Corporation, Osaka, Japan
<b>Nanodrop</b>	Thermo Scientific NanoDrop™ 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<b>Paintshaker</b>	Minimix MK4	Merris Engineering Ltd, Milltown Co Galway, Irland
<b>Photometer</b>	Ultrospec 3100 <i>pro</i>	Amersham Biosciences, England
<b>Photometer</b>	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
<b>Reinstwasseranlage</b>	Arium®611	Sartorius AG, Göttingen
<b>Thermocycler</b>	TProfessional Basic/ TProfessional Basic Gradient	Biometra GmbH, Göttingen
<b>Thermocycler</b>	FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena
<b>Transilluminator</b>	-	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<b>Ultraschallbad</b>	Elmasonic S120	Elma Schmidbauer GmbH, Singen
<b>Ultrazentrifuge</b>	Avanti™ J30-I Centrifuge, Rotor: JA-30.50 Ti	Beckmann Coulter, Kalifornien, USA
<b>UV-Transilluminator</b>	-	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
<b>Wasserbad</b>	Laborota 4000 – efficient	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
<b>Wasserbad</b>	Thermo Haake® DC–V10	Thermo Electron Coporation/ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
<b>Vortexer</b>	IKA® Vortex Genius 3	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
<b>Zentrifuge</b>	Eppendorf® Minispin	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Zentrifuge</b>	Sigma 1-15PK/ Sigma 1-15K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
<b>Zentrifuge</b>	GS-6R Centrifuge	Beckmann Coulter, Kalifornien, USA
<b>Zentrifuge</b>	Beckman GS6KR, Rotor: 712	Beckmann Coulter, Kalifornien, USA
<b>Zentrifuge</b>	Beckmann Coulter Allegra TH64R Centrifuge	Beckmann Coulter, Kalifornien, USA
<b>Zentrifuge</b>	Beckman J2-21; Rotor: E17310	Beckmann Coulter, Kalifornien, USA

**Tabelle A10: Glucosinolate in Samen von *A. thaliana* Genotypen.** Der Glucosinolatgehalt wurde über Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt. Die Samen wurden innerhalb einer Woche nach der Ernte vermessen. Angegeben wurde der MW  $\pm$  SD in  $\mu\text{mol/g}$  TG aus  $n = 4$  unabhängig geerntete Samenpools. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , t-Test.

	<b>3OHP</b>	<b>4MSOB</b>	<b>7MSOH</b>	<b>8MSOO</b>
<b>Col-0</b>	2,10 $\pm$ 0,73	3,18 $\pm$ 0,51	1,11 $\pm$ 0,59	3,98 $\pm$ 1,31
<b>nsp1-1</b>	2,28 $\pm$ 0,25	3,26 $\pm$ 0,72	1,16 $\pm$ 0,27	4,21 $\pm$ 0,99
<b>nsp2-1</b>	2,04 $\pm$ 1,03	2,61 $\pm$ 0,56	1,16 $\pm$ 0,49	4,43 $\pm$ 1,27
<b>nsp2-2</b>	2,63 $\pm$ 0,46	4,46 $\pm$ 0,92*	1,21 $\pm$ 0,36	4,04 $\pm$ 0,83
<b>nsp3-2</b>	2,17 $\pm$ 0,32	1,82 $\pm$ 0,848*	1,02 $\pm$ 0,26	4,25 $\pm$ 0,74
<b>nsp4-1</b>	1,89 $\pm$ 0,26	1,38 $\pm$ 0,17**	0,93 $\pm$ 0,20	3,99 $\pm$ 0,49
<b>nsp5-1</b>	2,19 $\pm$ 0,38	2,14 $\pm$ 0,45*	1,04 $\pm$ 0,39	4,20 $\pm$ 1,31

	<b>4MTB</b>	<b>7MTH</b>	<b>8MTO</b>	<b>3BZO</b>
<b>Col-0</b>	21,82 $\pm$ 4,32	2,30 $\pm$ 0,65	2,33 $\pm$ 0,42	2,89 $\pm$ 0,70
<b>nsp1-1</b>	23,67 $\pm$ 5,28	2,83 $\pm$ 0,61	2,73 $\pm$ 0,65	3,18 $\pm$ 0,76
<b>nsp2-1</b>	21,17 $\pm$ 1,81	2,68 $\pm$ 0,62	2,78 $\pm$ 0,38	2,94 $\pm$ 0,40
<b>nsp2-2</b>	22,85 $\pm$ 3,87	2,26 $\pm$ 0,71	2,01 $\pm$ 0,35	2,78 $\pm$ 0,21
<b>nsp3-2</b>	17,31 $\pm$ 1,82	3,02 $\pm$ 0,68	2,95 $\pm$ 0,80	2,68 $\pm$ 0,33
<b>nsp4-1</b>	14,09 $\pm$ 1,63	2,94 $\pm$ 0,67	3,16 $\pm$ 0,57	2,44 $\pm$ 0,39
<b>nsp5-1</b>	15,86 $\pm$ 3,26	2,73 $\pm$ 0,75	2,87 $\pm$ 0,62	2,72 $\pm$ 0,44

	<b>4BZO</b>	<b>I3M</b>	<b>4OHI3M</b>
<b>Col-0</b>	4,40 $\pm$ 1,18	3,47 $\pm$ 1,32	0,13 $\pm$ 0,06
<b>nsp1-1</b>	4,93 $\pm$ 1,13	3,39 $\pm$ 0,76	0,15 $\pm$ 0,06
<b>nsp2-1</b>	5,61 $\pm$ 0,75	3,00 $\pm$ 0,64	0,11 $\pm$ 0,06
<b>nsp2-2</b>	5,01 $\pm$ 0,29	3,91 $\pm$ 0,71	0,14 $\pm$ 0,07
<b>nsp3-2</b>	6,02 $\pm$ 1,10	2,94 $\pm$ 0,52	0,11 $\pm$ 0,06
<b>nsp4-1</b>	5,90 $\pm$ 0,64	2,67 $\pm$ 0,16	0,11 $\pm$ 0,16
<b>nsp5-1</b>	6,05 $\pm$ 1,50	3,05 $\pm$ 1,10	0,12 $\pm$ 0,06

**Tabelle A11: Intakte Glucosinolate in wässrigen Homogenaten der Samen von *A. thaliana*.** Intakte Glucosinolate im wässrigen Homogenat wurden als Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt. Die Samen wurden innerhalb einer Woche nach der Ernte vermessen. Angegeben wurde der MW  $\pm$  SD in  $\mu\text{mol/g}$  TG aus  $n = 3$  unabhängig geernteten Samenpools. Fortsetzung der Tabelle auf S. XXV.

	<b>3OHP</b>	<b>4MSOB</b>	<b>7MSOH</b>	<b>8MSOO</b>
<b>Col-0</b>	1,50 $\pm$ 0,1	2,54 $\pm$ 1,36	0,64 $\pm$ 0,07	2,37 $\pm$ 0,53
<b>nsp1-1</b>	1,88 $\pm$ 0,35	2,90 $\pm$ 0,69	0,80 $\pm$ 0,15	2,74 $\pm$ 0,46
<b>nsp2-1</b>	1,59 $\pm$ 0,18	1,76 $\pm$ 0,89	0,64 $\pm$ 0,05	2,40 $\pm$ 0,38
<b>nsp2-2</b>	1,97 $\pm$ 0,64	3,01 $\pm$ 0,98	0,77 $\pm$ 0,12	2,62 $\pm$ 0,33
<b>nsp3-2</b>	1,61 $\pm$ 0,29	1,18 $\pm$ 0,52	0,72 $\pm$ 0,26	2,73 $\pm$ 0,54
<b>nsp4-1</b>	1,33 $\pm$ 0,31	1,17 $\pm$ 0,47	0,65 $\pm$ 0,06	2,56 $\pm$ 0,21
<b>nsp5-1</b>	1,53 $\pm$ 0,07	1,40 $\pm$ 0,42	0,68 $\pm$ 0,22	2,61 $\pm$ 0,76

	4MTB	7MTH	8MTO	3BZO
<b>Col-0</b>	9,29 ± 5,47	0,44 ± 0,43	0,54 ± 0,53	0,87 ± 0,51
<b>nsp1-1</b>	9,49 ± 3,98	0,27 ± 0,26	0,34 ± 0,30	0,77 ± 0,32
<b>nsp2-1</b>	9,40 ± 3,47	0,50 ± 0,23	0,52 ± 0,45	0,92 ± 0,37
<b>nsp2-2</b>	11,97 ± 3,85	0,56 ± 0,05	0,59 ± 0,13	1,14 ± 0,25
<b>nsp3-2</b>	8,12 ± 2,22	0,59 ± 0,31	0,60 ± 0,25	0,89 ± 0,38
<b>nsp4-1</b>	6,39 ± 1,96	0,50 ± 0,38	0,56 ± 0,43	0,80 ± 0,30
<b>nsp5-1</b>	6,80 ± 1,67	0,37 ± 0,21	0,47 ± 0,23	0,84 ± 0,02

	4BZO	I3M	4OHI3M
<b>Col-0</b>	1,12 ± 0,76	2,30 ± 1,08	0,04 ± 0,07
<b>nsp1-1</b>	0,72 ± 0,25	1,99 ± 0,22	0,03 ± 0,06
<b>nsp2-1</b>	1,24 ± 0,53	2,13 ± 0,13	0,04 ± 0,07
<b>nsp2-2</b>	1,66 ± 0,32	3,08 ± 0,74	0,05 ± 0,09
<b>nsp3-2</b>	1,75 ± 1,50	2,18 ± 0,12	0,04 ± 0,06
<b>nsp4-1</b>	1,73 ± 0,93	1,81 ± 0,26	0,03 ± 0,05
<b>nsp5-1</b>	1,59 ± 0,49	1,95 ± 0,59	0

**Tabelle A12: Summe aus intaktem 4MTB-Glucosinolat und den Abbauprodukten des 4MTB-Glucosinolats in wässrigen Homogenaten der Samen von *A. thaliana*.** Intakte Glucosinolate im wässrigen Homogenat wurden als Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt. Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Die Samen wurden innerhalb einer Woche nach der Ernte vermessen. Angegeben wurde die Summe der MW ± SD in µmol/g TG aus n = 3 unabhängig geernteten Samenpools.

	4MTB
<b>Col-0</b>	23,69 ± 7,89
<b>nsp1-1</b>	28,62 ± 5,19
<b>nsp2-1</b>	11,68 ± 3,84
<b>nsp2-2</b>	15,05 ± 4,08
<b>nsp3-2</b>	18,77 ± 4,91
<b>nsp4-1</b>	12,67 ± 2,74
<b>nsp5-1</b>	21,68 ± 6,20

**Tabelle A13: 4MTB-Glucosinolat in Samen von *A. thaliana*.** Drei unabhängig geerntete Samenchargen wurden untersucht. Der Glucosinolatgehalt wurde über Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt. Angegeben wurde der Gehalt in µmol/g TG über die Lagerungszeit in Monaten. Fortsetzung der Tabelle auf S. XXVI.

4MTB-Glucosinolat	T-DNA-Mutante	0 Monate	7 Monate	9 Monate	19 Monate
<b>Charge 1</b>	<b>nsp1-1</b>	18,25	18,84	-	19,03
	<b>nsp2-1</b>	23,14	18,65	-	20,34
	<b>nsp2-2</b>	17,55	19,96	-	16,28
	<b>nsp3-2</b>	15,92	16,52	-	12,85
	<b>nsp4-1</b>	11,91	13,33	-	10,92
	<b>nsp5-1</b>	12,86	13,22	-	12,04
<b>Charge 2</b>	<b>nsp1-1</b>	20,08	-	21,76	-
	<b>nsp2-1</b>	21,94	-	23,83	-
	<b>nsp2-2</b>	25,90	-	27,93	-
	<b>nsp3-2</b>	16,49	-	17,22	-
	<b>nsp4-1</b>	13,96	-	14,96	-
	<b>nsp5-1</b>	16,56	-	18,92	-

<b>Charge 3</b>	<i>nsp1-1</i>	27,61	20,19	-	-
	<i>nsp2-1</i>	18,91	15,76	-	-
	<i>nsp2-2</i>	25,56	24,31	-	-
	<i>nsp3-2</i>	16,86	15,15	-	-
	<i>nsp4-1</i>	14,74	13,21	-	-
	<i>nsp5-1</i>	13,87	11,97	-	-

**Tabelle A14: Abbau des 4MTB-Glucosinolats in Homogenaten der Samen von *A. thaliana*.** Drei unabhängig geerntete Samenchargen wurden untersucht. Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat im wässrigen Homogenat wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Angegeben wurde der Gehalt in  $\mu\text{mol/g}$  TG über die Lagerungszeit in Monaten.

<b>Nitril + Isothiocyanat des 4MTB- Glucosinolats im wässrigen Homogenat</b>	<b>T-DNA- Mutante</b>	<b>0 Monate</b>	<b>7 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>19 Monate</b>
<b>Charge 1</b>	<i>nsp1-1</i>	26,55	13,93	-	12,24
	<i>nsp2-1</i>	1,90	3,03	-	7,37
	<i>nsp2-2</i>	2,07	1,17	-	4,22
	<i>nsp3-2</i>	15,26	3,72	-	1,64
	<i>nsp4-1</i>	5,16	0,81	-	3,53
	<i>nsp5-1</i>	23,22	5,11	-	0,56
<b>Charge 2</b>	<i>nsp1-1</i>	10,41	-	5,22	-
	<i>nsp2-1</i>	2,68	-	0,99	-
	<i>nsp2-2</i>	2,19	-	1,17	-
	<i>nsp3-2</i>	7,84	-	1,58	-
	<i>nsp4-1</i>	3,06	-	0,80	-
	<i>nsp5-1</i>	7,60	-	1,80	-
<b>Charge 3</b>	<i>nsp1-1</i>	20,42	7,40	-	-
	<i>nsp2-1</i>	2,25	0,84	-	-
	<i>nsp2-2</i>	4,96	1,25	-	-
	<i>nsp3-2</i>	8,86	2,13	-	-
	<i>nsp4-1</i>	10,63	2,74	-	-
	<i>nsp5-1</i>	13,83	2,67	-	-

**Tabelle A15: Intaktes 4MTB-Glucosinolat in wässrigen Homogenaten der Samen von *A. thaliana*.** Drei unabhängig geerntete Samenchargen wurden untersucht. Intakte Glucosinolate im wässrigen Homogenat wurden als Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt. Angegeben wurde der Gehalt in  $\mu\text{mol/g}$  TG über die Lagerungszeit in Monaten. Fortsetzung der Tabelle auf S. XXVII.

<b>Intaktes 4MTB- Glucosinolat im wässrigen Homogenat</b>	<b>T-DNA- Mutante</b>	<b>0 Monate</b>	<b>7 Monate</b>	<b>9 Monate</b>	<b>19 Monate</b>
<b>Charge 1</b>	<i>nsp1-1</i>	4,92	3,64	-	4,95
	<i>nsp2-1</i>	5,51	6,29	-	5,51
	<i>nsp2-2</i>	8,37	10,09	-	8,54
	<i>nsp3-2</i>	8,87	7,83	-	8,87
	<i>nsp4-1</i>	5,38	6,12	-	6,33
	<i>nsp5-1</i>	5,12	5,06	-	4,84
<b>Charge 2</b>	<i>nsp1-1</i>	12,22	-	13,67	-
	<i>nsp2-1</i>	12,19	-	10,75	-
	<i>nsp2-2</i>	16,02	-	13,62	-
	<i>nsp3-2</i>	9,87	-	11,17	-



	<i>nsp4-1</i>	8,65	-	8,68	-
	<i>nsp5-1</i>	8,46	-	6,48	-
<b>Charge 3</b>	<i>nsp1-1</i>	11,33	10,39	-	-
	<i>nsp2-1</i>	10,51	9,43	-	-
	<i>nsp2-2</i>	11,54	11,92	-	-
	<i>nsp3-2</i>	5,62	5,96	-	-
	<i>nsp4-1</i>	5,13	5,30	-	-
	<i>nsp5-1</i>	6,82	6,13	-	-

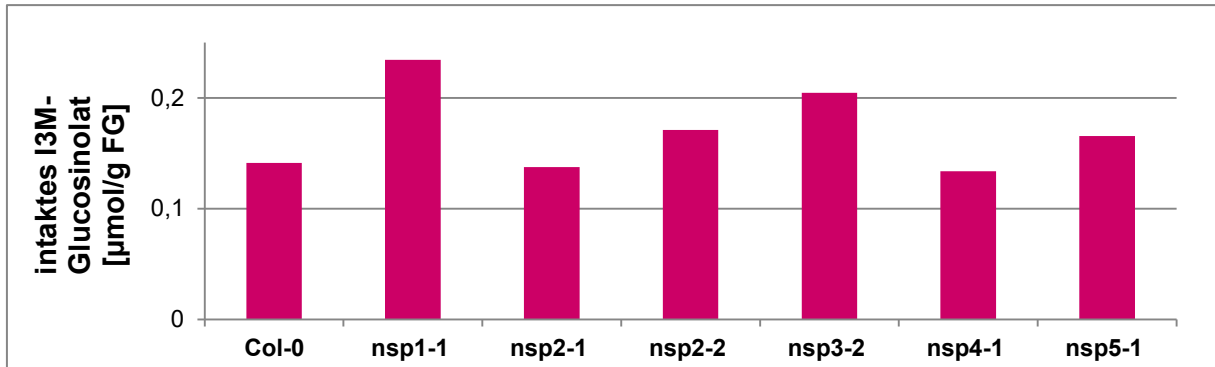
**Tabelle A16: Glucosinolate in Keimlingen von *A. thaliana*.** Der Glucosinolatgehalt wurde über Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt. Die Keimlinge wurden im Zweiblattstadium analysiert. Angegeben wurde der Gehalt in  $\mu\text{mol/g}$  FG stichprobenartig für eine Charge, für *nsp4-1* aus  $n = 3$  unabhängig geernteten Keimlingschargen.

	<b>4MSOB</b>	<b>7MSOH</b>	<b>8MSOO</b>	<b>4MTB</b>
<b>Col-0</b>	0,19	0,02	0,04	0,14
<i>nsp1-1</i>	0,19	0,02	0,04	0,12
<i>nsp2-1</i>	0,18	0,02	0,04	0,12
<i>nsp2-2</i>	0,12	0,02	0,03	0,14
<i>nsp3-2</i>	0,17	0,02	0,04	0,09
<i>nsp4-1</i>	$0,16 \pm 0,08$	$0,01 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$
<i>nsp5-1</i>	0,12	0,02	0,04	0,06

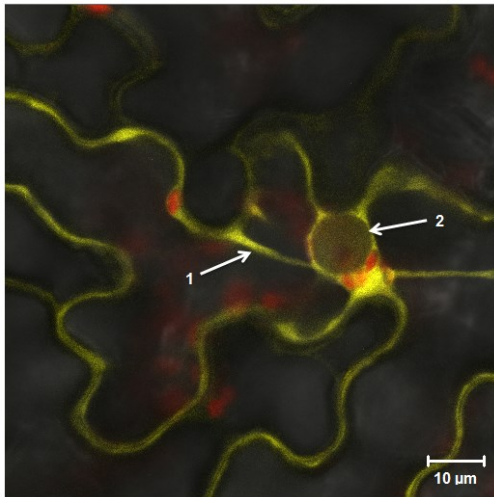
	<b>7MTH</b>	<b>8MTO</b>	<b>4BZO</b>
<b>Col-0</b>	0,02	0,02	0,03
<i>nsp1-1</i>	0,02	0,02	0,04
<i>nsp2-1</i>	0	0,02	0,03
<i>nsp2-2</i>	0,02	0,02	0,02
<i>nsp3-2</i>	0,01	0,02	0,03
<i>nsp4-1</i>	$0,02 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,06$
<i>nsp5-1</i>	0	0,01	0,03

	<b>I3M</b>	<b>1MOI3M</b>	<b>4MOI3M</b>
<b>Col-0</b>	0,33	0,12	0,03
<i>nsp1-1</i>	0,32	0,12	0,03
<i>nsp2-1</i>	0,27	0,11	0,03
<i>nsp2-2</i>	0,30	0,11	0,03
<i>nsp3-2</i>	0,29	0,09	0,02
<i>nsp4-1</i>	$0,32 \pm 0,08$	$0,11 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,01$
<i>nsp5-1</i>	0,27	0,09	0,02

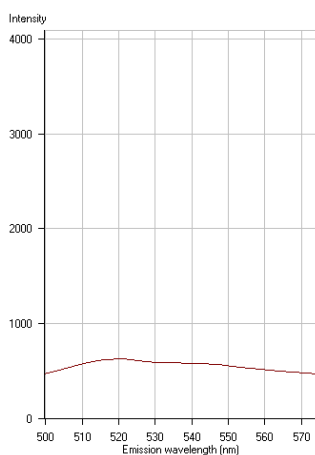
## A.2. Abbildungen



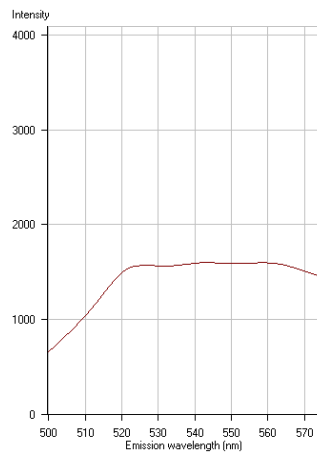
**Abbildung A1: Intaktes I3M-Glucosinolat in wässrigen Homogenaten von *A. thaliana*.** Intakte Glucosinolate im wässrigen Homogenat wurden als Desulfoglucosinolate mittels HPLC bestimmt. Die Keimlinge wurden im Zweiblattstadium analysiert. Angegeben wurde der Gehalt in µmol/g FG stichprobenartig für eine Charge.



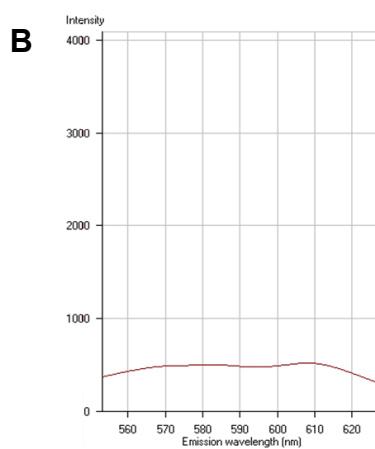
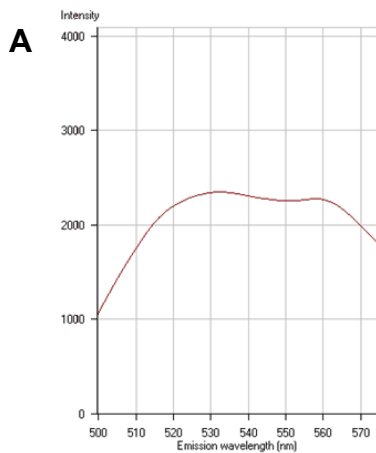
**Abbildung A2: Subzelluläre Lokalisation von TGG1-oSP-Venus nach Produktion in *N. benthamiana*.** Drei bis vier Tage nach der Transformation von *N. benthamiana* wurden cLSM-Aufnahmen im Channel-Modus bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Ein zweites unabhängiges Experiment zeigte vergleichbare Ergebnisse. 1: Cytoplasmastrang; 2: Zellkern.



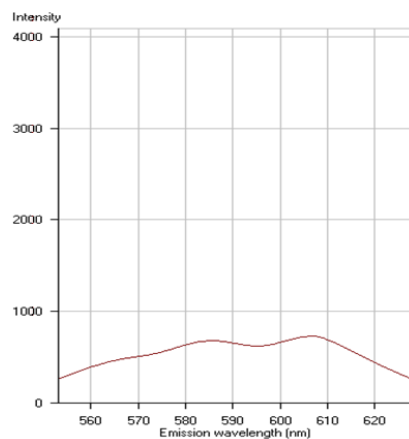
**Abbildung A3: BiFC nach getrennter Produktion von CLuc-SCYCE und eqFP611-VYNE in *N. benthamiana* und nachfolgender Extraktion.** Vier Tage nach der Infiltration wurden die Extrakte von CLuc-SCYCE und eqFP611-VYNE getrennt aufgearbeitet. Das vereinigte Extrakt wurde über Nacht bei 4°C gelagert und mit dem cLSM-510META ausgewertet.



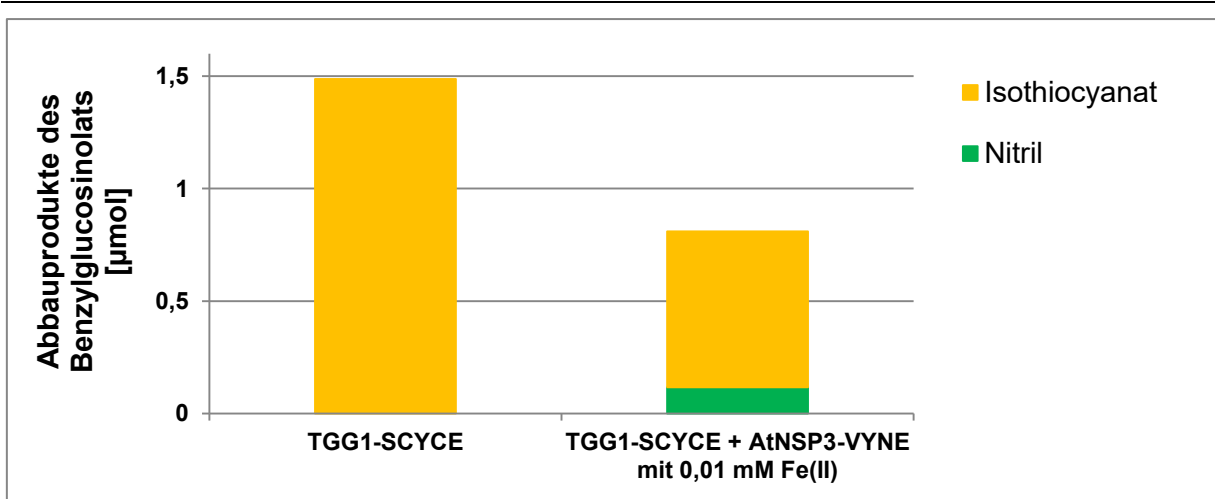
**Abbildung A4: BiFC nach getrennter Produktion von TGG1-SCYCE und CLuc-VYNE in *N. benthamiana* und nachfolgender Extraktion.** Vier Tage nach der Infiltration wurden die Extrakte von TGG1-SCYCE und CLuc-VYNE getrennt aufgearbeitet. Das vereinigte Extrakt wurde über Nacht bei 4°C gelagert und mit dem cLSM-510META ausgewertet.



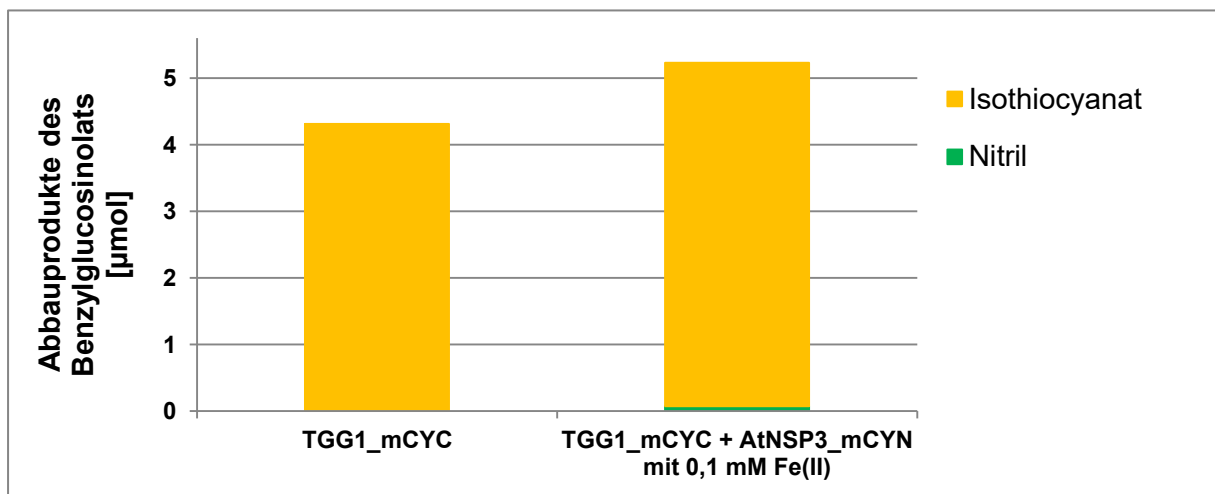
**Abbildung A5: Vorversuch mit nicht-infiltrierten Blättern von *N. benthamiana*.** Extrakte nicht-infiltrierter Tabakblätter wurden mit dem cLSM-510META ausgewertet. A: Bildaufnahme im Lambda-Modus im Bereich von 500 bis 575 nm mit dem Argonlaser. B: Bildaufnahme im Lambda-Modus im Bereich von 555 bis 630 nm mit dem Helium-Neon-Laser.



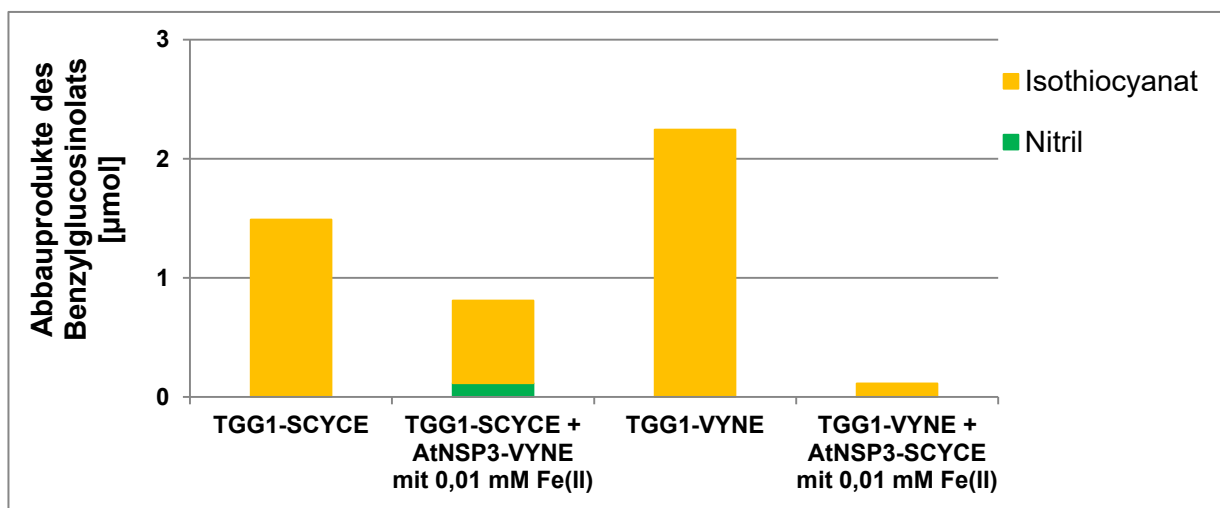
**Abbildung A6: BiFC nach getrennter Produktion von TGG1-mCYC und AtNSP3-mCYN in *N. benthamiana* und nachfolgender Extraktion.** Vier Tage nach der Infiltration wurden die Extrakte von TGG1-mCYC und AtNSP3-mCYN getrennt aufgearbeitet. Das vereinigte Extrakt wurde 1,5 h in Dunkelheit gelagert und mit dem cLSM-510META ausgewertet.



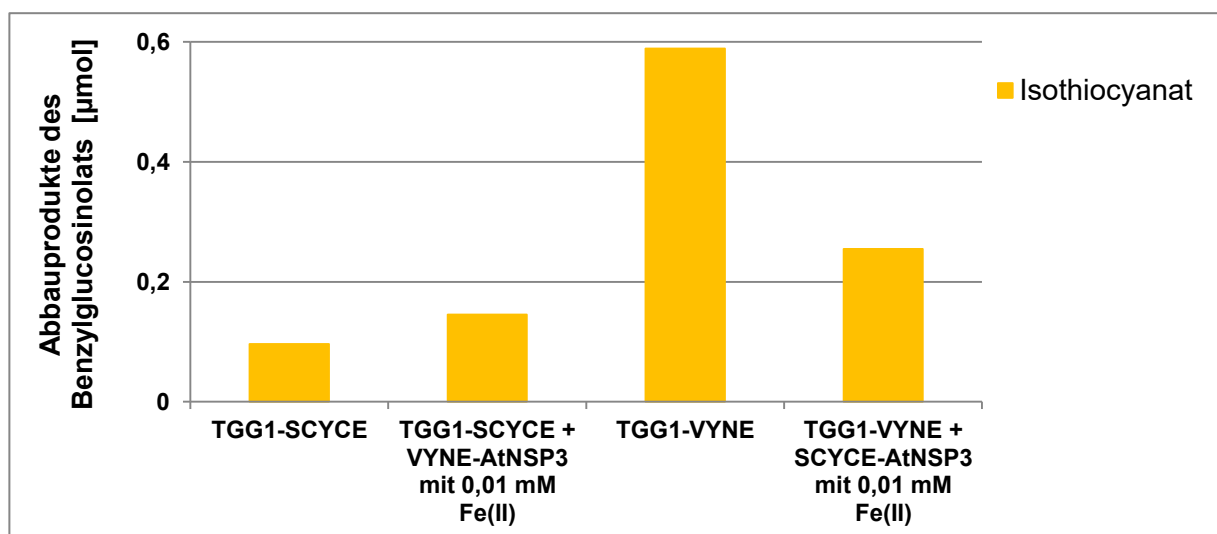
**Abbildung A7: Untersuchungen zur Myrosinase- und NSP-Aktivität.** Vier bis fünf Tage nach der Infiltration wurde das Blattmaterial geerntet und aufgearbeitet. In Anwesenheit von AtNSP3 wurden die Proben mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  (Endkonzentration 0,01 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ ) versetzt. Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Dargestellt wurde der Gehalt der Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats in  $\mu\text{mol}$ .



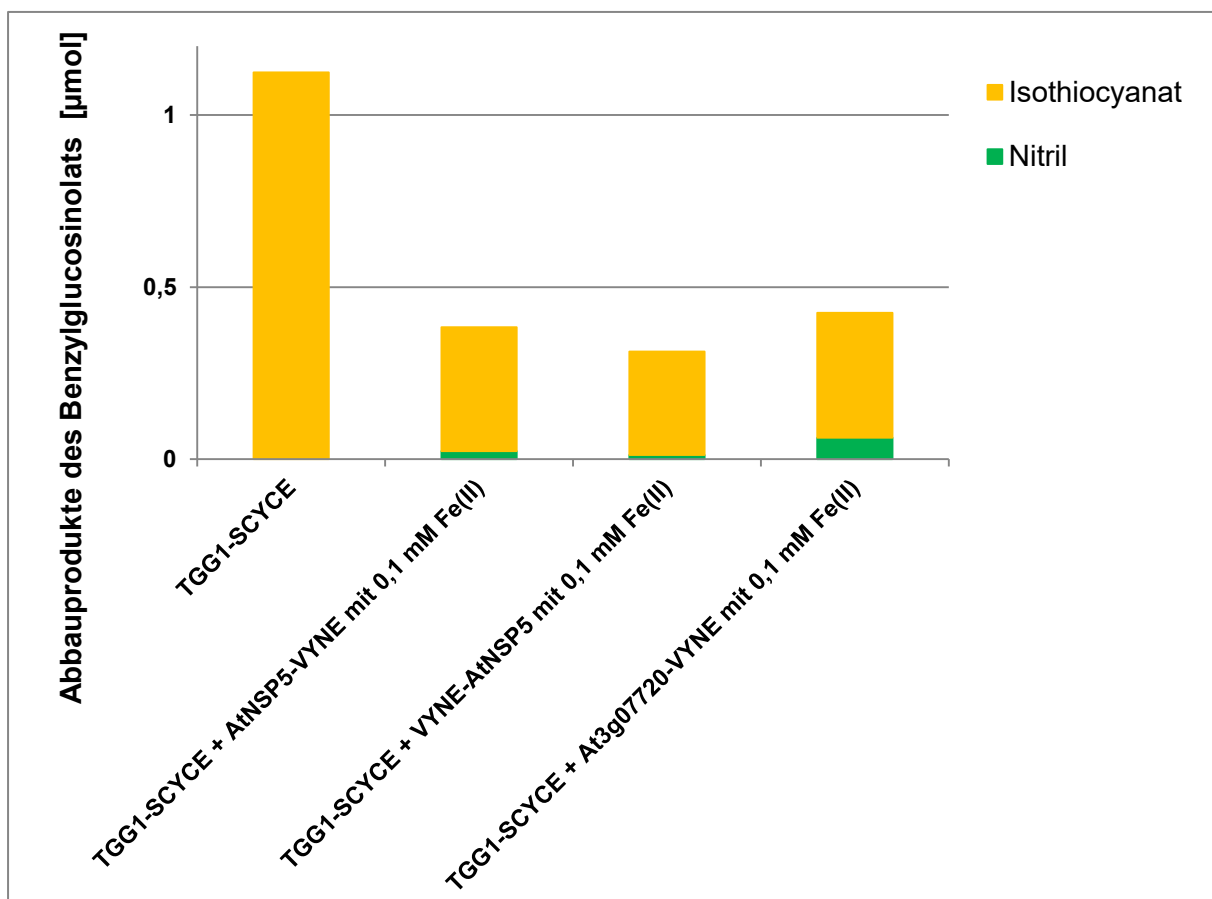
**Abbildung A8: Untersuchungen zur Myrosinase- und NSP-Aktivität.** Vier bis fünf Tage nach der Infiltration wurde das Blattmaterial geerntet und aufgearbeitet. In Anwesenheit von AtNSP3 wurden die Proben mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  (Endkonzentration 0,01 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ ) versetzt. Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Dargestellt wurde der Gehalt der Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats in  $\mu\text{mol}$ .



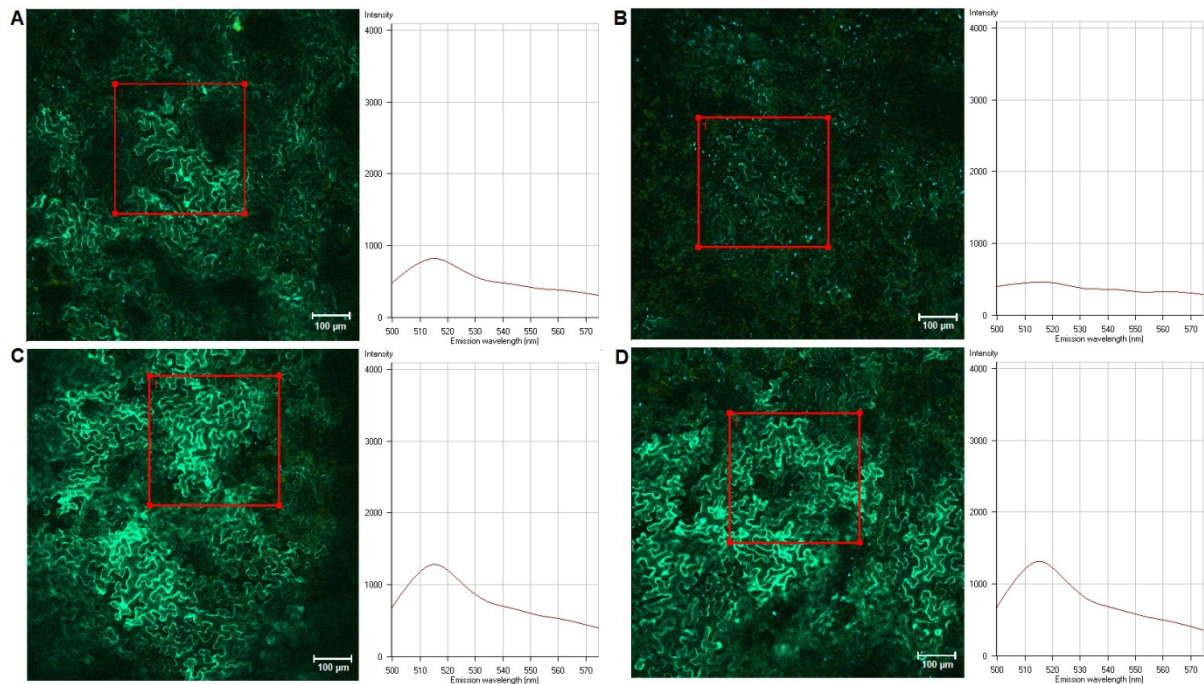
**Abbildung A9: Untersuchungen zur Myrosinase- und NSP-Aktivität.** Vier bis fünf Tage nach der Infiltration wurde das Blattmaterial geerntet und aufgearbeitet. In Anwesenheit von AtNSP3 wurden die Proben mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  (Endkonzentration 0,01 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ ) versetzt. Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Dargestellt wurde der Gehalt der Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats in μmol.



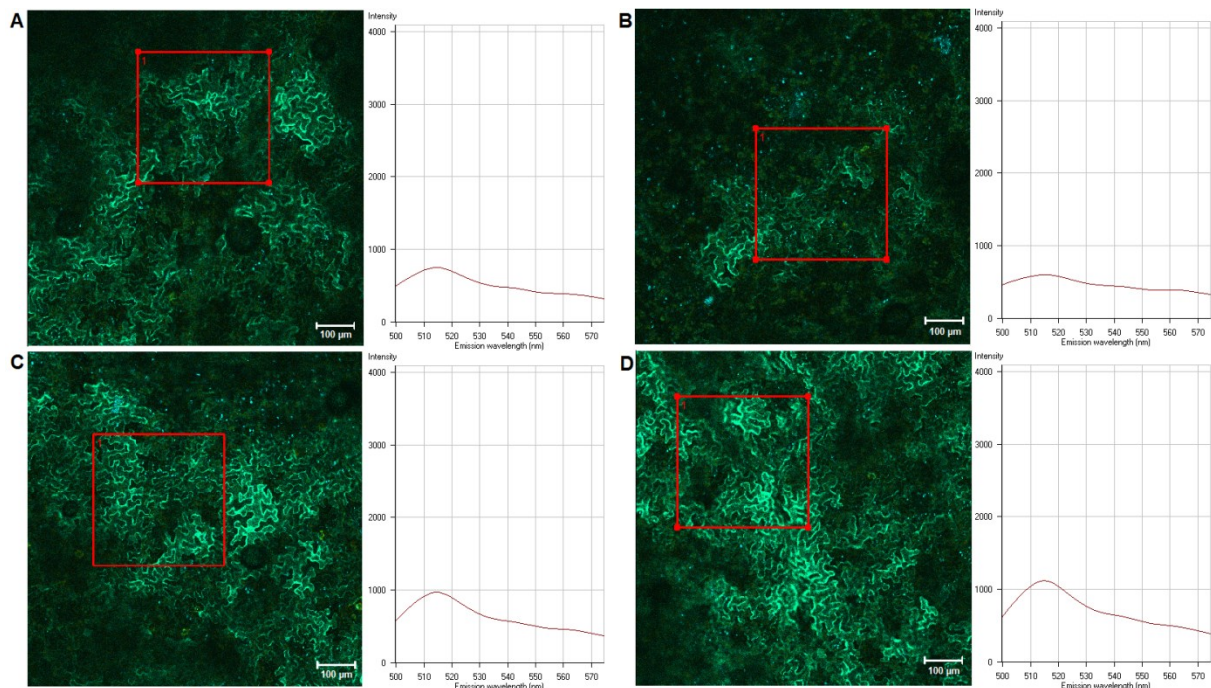
**Abbildung A10: Untersuchungen zur Myrosinase- und NSP-Aktivität.** Vier bis fünf Tage nach der Infiltration wurde das Blattmaterial geerntet und aufgearbeitet. In Anwesenheit von AtNSP3 wurden die Proben mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  (Endkonzentration 0,01 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ ) versetzt. Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurden mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Dargestellt wurde der Gehalt der Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats in μmol.



**Abbildung A11: Untersuchungen zur Myrosinase- und NSP-Aktivität.** Vier bis fünf Tage nach der Infiltration wurde das Blattmaterial geerntet und aufgearbeitet. In Anwesenheit von AtNSP5 oder At3g07720 wurden die Proben mit 0,1 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$  (Endkonzentration 0,01 mM  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ ) versetzt. Die Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats wurden mittels GC-MS identifiziert mittels und GC-FID quantifiziert. Dargestellt wurde der Gehalt der Abbauprodukte Nitril und Isothiocyanat des Benzylglucosinolats in  $\mu\text{mol}$ .

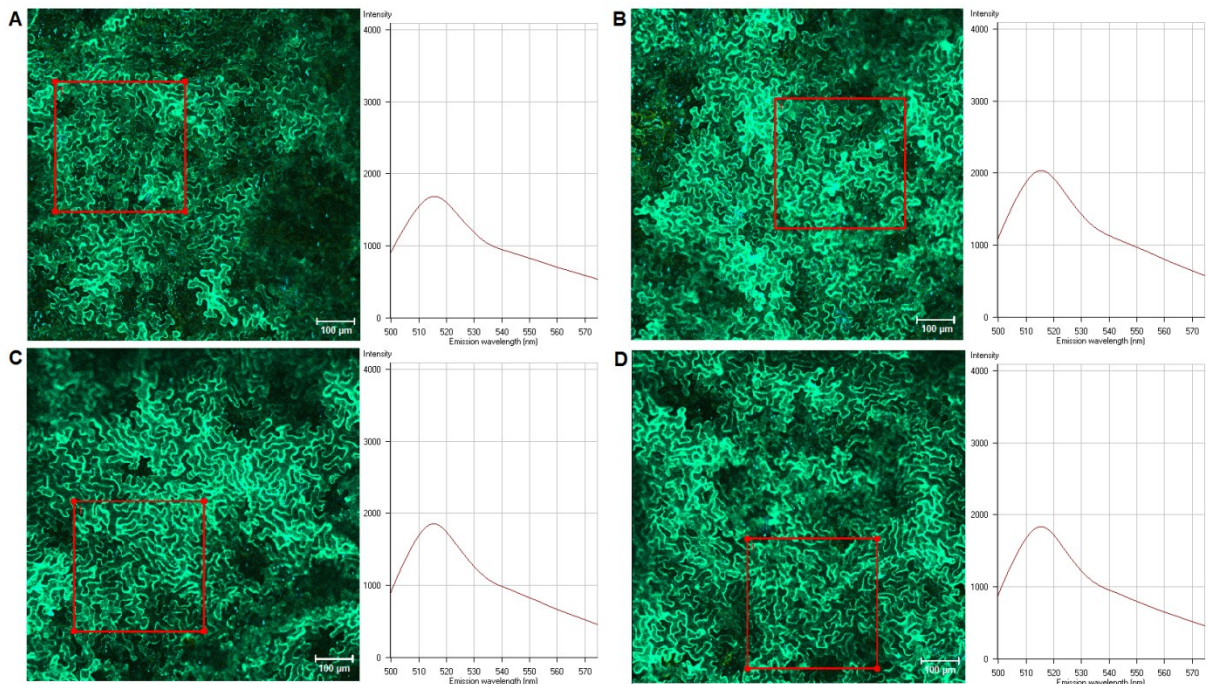


**Abbildung A12: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP3 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-SCYCE und VYNE-AtNSP3; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-SCYCE und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und VYNE-AtNSP3; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

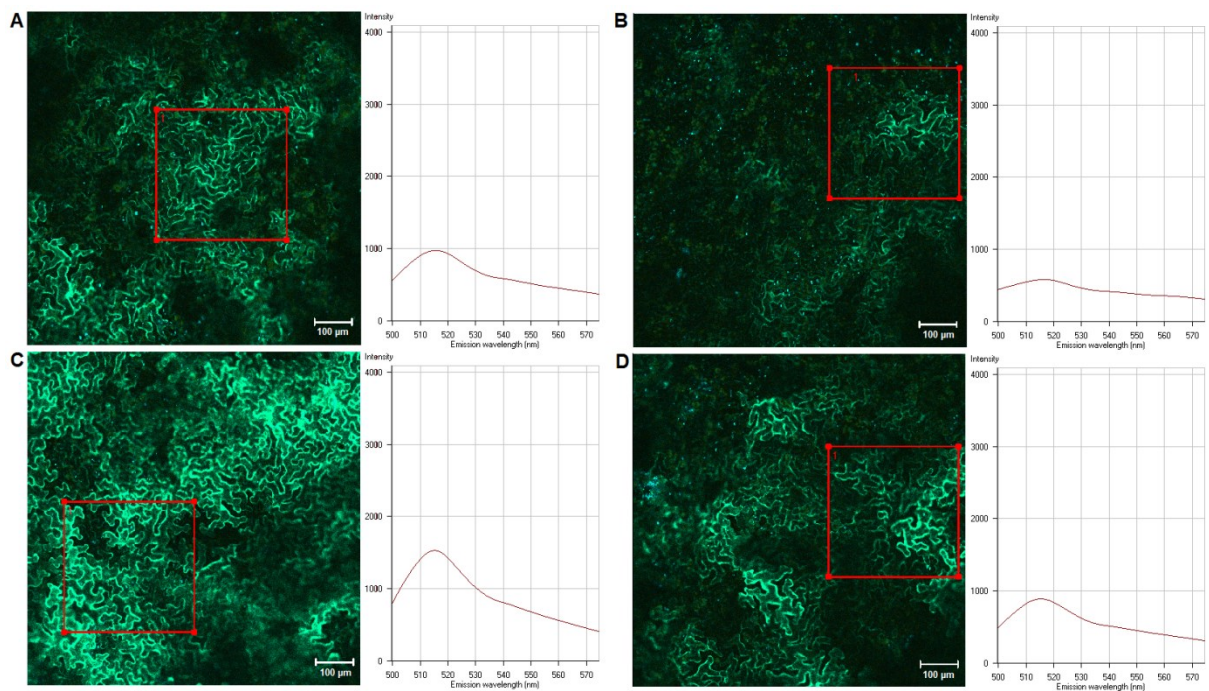


**Abbildung A13: Interaktionsstudien zwischen TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz TGG1-oSP-VYNE und AtNSP3-SCYCE; B: Negativkontrolle TGG1-oSP-VYNE und Cnx1-SCYCE; C: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und AtNSP3-SCYCE; D: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und Cnx1-SCYCE.



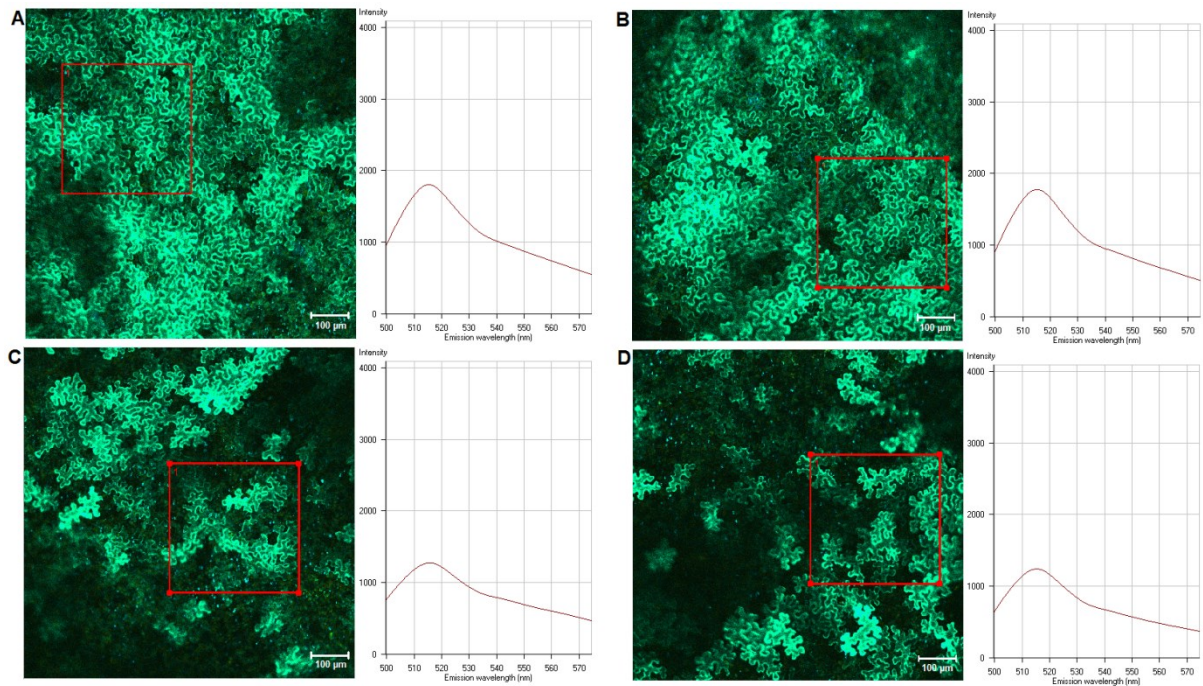


**Abbildung A14: Interaktionsstudien zwischen VYNE-TGG1-oSP und AtNSP3-SCYCE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz VYNE-TGG1-oSP und AtNSP3-SCYCE; B: Negativkontrolle VYNE-TGG1-oSP und Cnx1-SCYCE; C: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und AtNSP3-SCYCE; D: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und Cnx1-SCYCE.

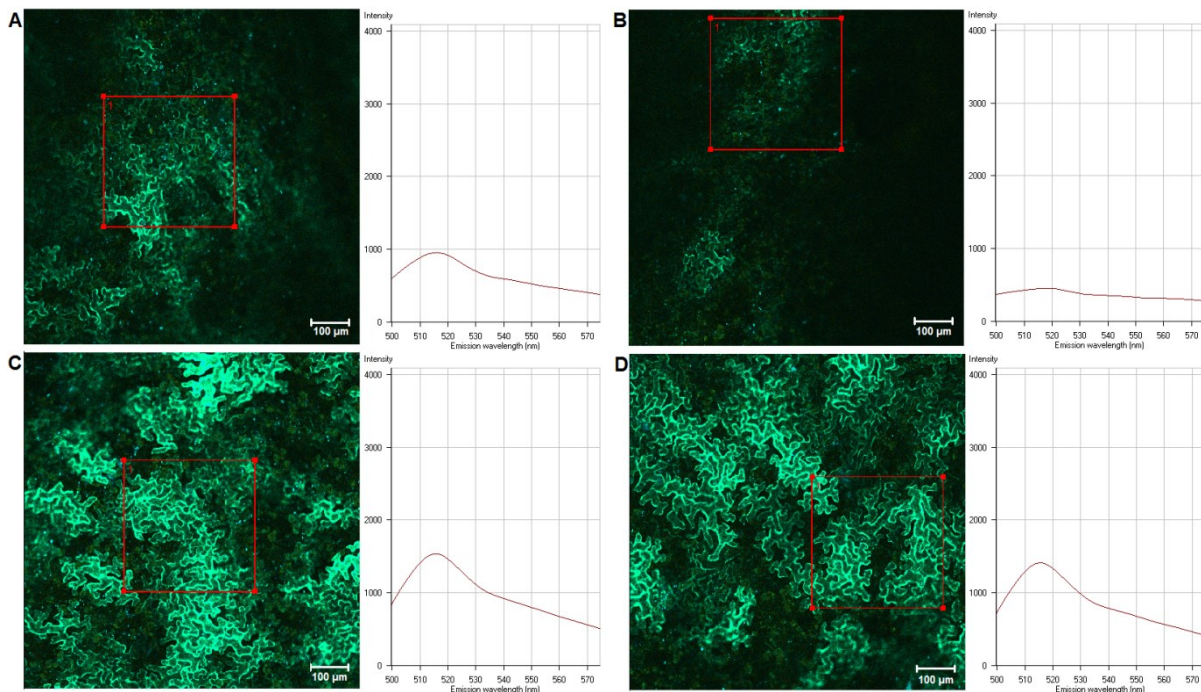


**Abbildung A15: Interaktionsstudien zwischen VYNE-TGG1-oSP und SCYCE-AtNSP3 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz VYNE-TGG1-oSP und SCYCE-AtNSP3; B: Negativkontrolle VYNE-TGG1-oSP und Cnx1-SCYCE; C: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und SCYCE-AtNSP3; D: Abundanzkontrolle CLuc-VYNE und Cnx1-SCYCE.



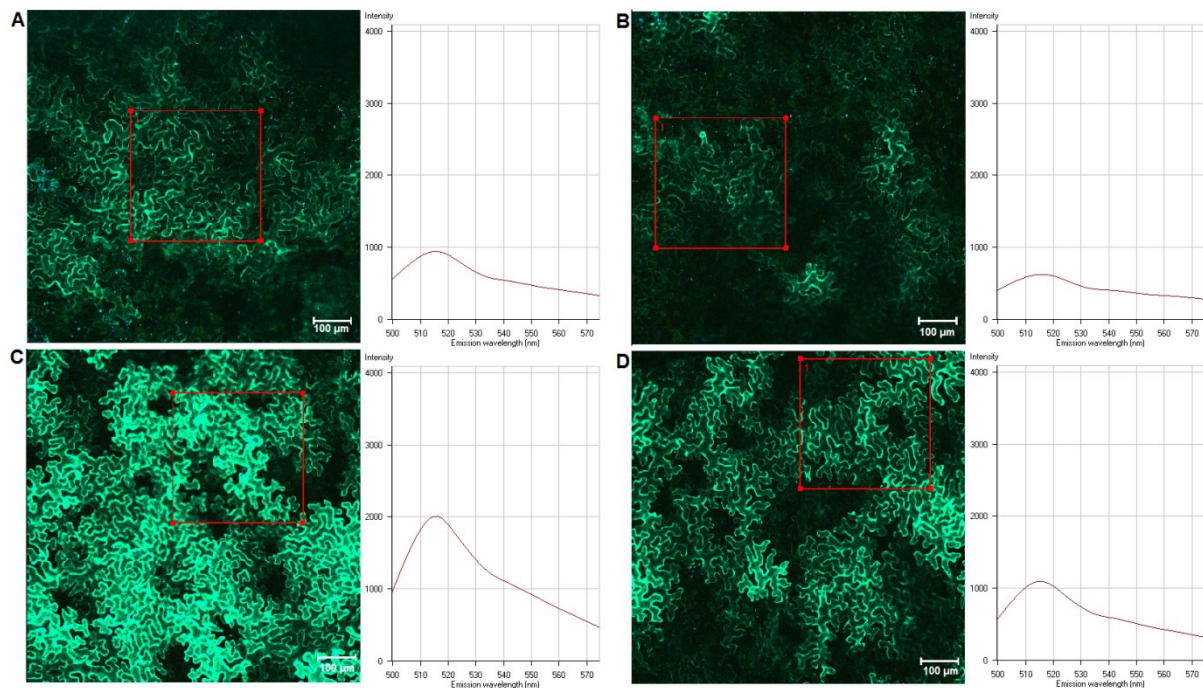


**Abbildung A16: Interaktionsstudien zwischen SCYCE-TGG1-oSP und AtNSP5-VYNE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP und AtNSP5-VYNE; B: Negativkontrolle SCYCE-TGG1-oSP und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und AtNSP5-VYNE; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

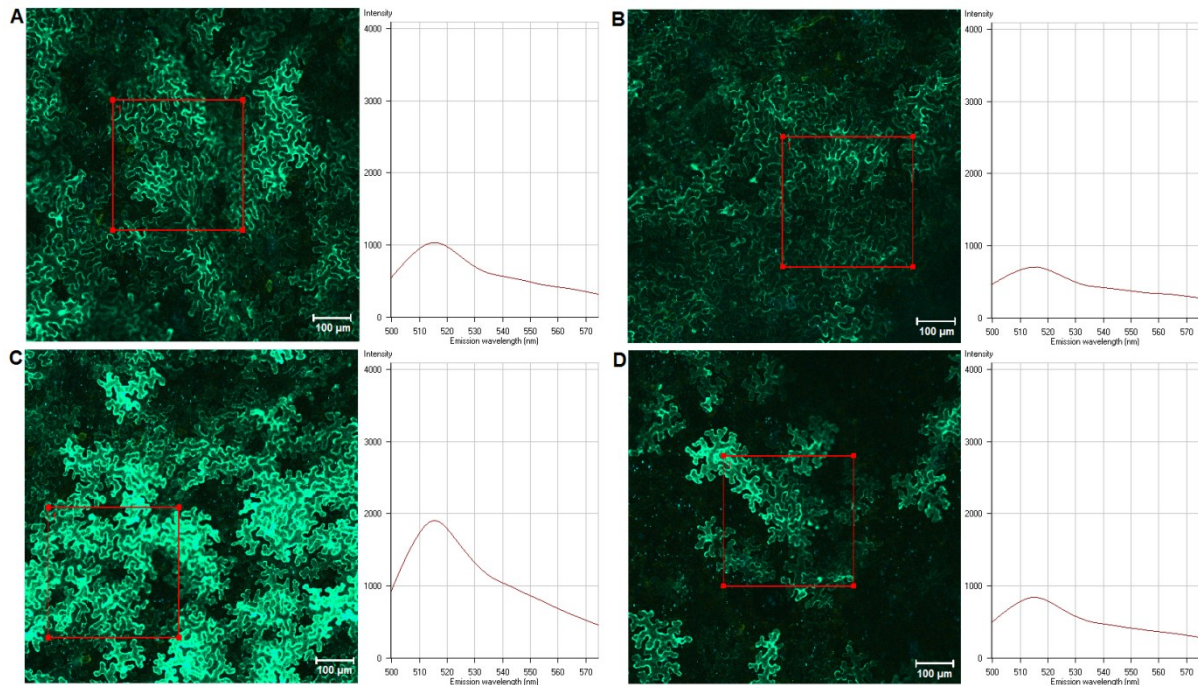


**Abbildung A17: Interaktionsstudien zwischen SCYCE-TGG1-oSP und AtNSP5-VYNE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP und AtNSP5-VYNE, B: Negativkontrolle SCYCE-TGG1-oSP und Cnx1-VYNE, C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und AtNSP5-VYNE, D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.

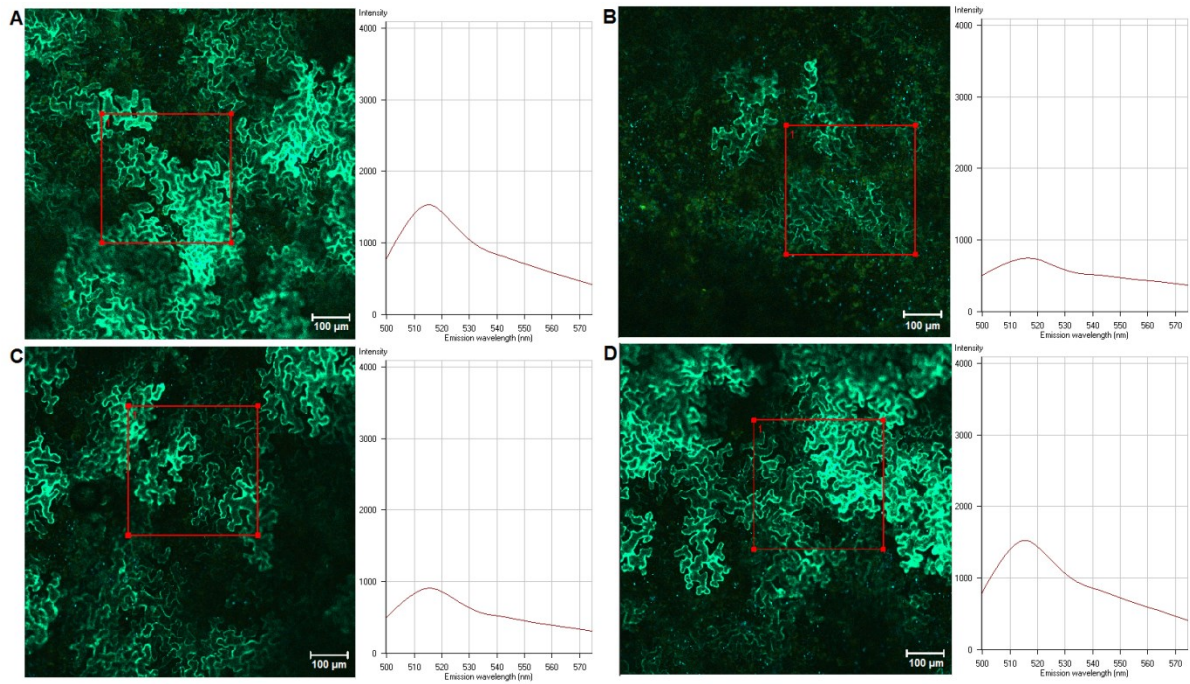




**Abbildung A18: Interaktionsstudien zwischen SCYCE-TGG1-oSP und VYNE-AtNSP5 nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP und VYNE-AtNSP5; B: Negativkontrolle SCYCE-TGG1-oSP und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und VYNE-AtNSP5; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.



**Abbildung A19: Interaktionsstudien zwischen SCYCE-TGG1-oSP und At3g07720-VYNE nach Produktion in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP und At3g07720-VYNE; B: Negativkontrolle SCYCE-TGG1-oSP und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und At3g07720-VYNE; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.



**Abbildung A20: Interaktionsstudien zwischen SCYCE-TGG1-oSP und At3g07720-VYNE nach Transformation in *N. benthamiana*.** Vier Tage nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit dem cLSM-510META ausgewertet. Bilder wurden im Lambda-Modus aufgenommen. A: Interaktionsansatz SCYCE-TGG1-oSP und At3g07720-VYNE; B: Negativkontrolle SCYCE-TGG1-oSP und Cnx1-VYNE; C: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und At3g07720-VYNE; D: Abundanzkontrolle CLuc-SCYCE und Cnx1-VYNE.